



Inês Lopes Costa da Silva

Licenciada em Genética e Biotecnologia

**Alteração da metilação do DNA
após exposição prolongada a fitoquímicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues, FCM/UNL

Co-orientador: Dra Célia Martins, FCM/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



Inês Lopes Costa da Silva

Licenciada em Genética e Biotecnologia

Alteração da metilação do DNA após exposição prolongada a fitoquímicos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues, FCM/UNL

Co-orientador: Dra Célia Martins, FCM/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Vogal: Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues, FCM/UNL

Alteração da metilação do DNA após exposição prolongada a fitoquímicos

Copyright Inês Lopes Costa da Silva, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“If we knew what it was we were doing,
it would not be called research, would it?”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação só foi possível graças ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de dedicar algumas palavras de agradecimento.

À **Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa** em nome do **Prof. Doutor Fernando Santana**, Magnífico Diretor da FCT.

À **Coordenação de Mestrado**, no nome da **Professora Doutora Paula Gonçalves**, e ao **Professor Doutor Jaime Mota**, orientador interno desta dissertação, por toda a disponibilidade e prontidão no esclarecimento de todas as minhas dúvidas.

Ao **Centro de Investigação de Genética Molecular Humana**, no nome do Diretor **Professor Doutor José Rueff**, pela oportunidade de me integrar neste projeto tão ambicioso e enriquecedor e pela disponibilização das suas instalações para a realização desta dissertação.

Ao **Professor Doutor António Sebastião Rodrigues**, o meu agradecimento por ter aceite ser meu orientador de dissertação e pela oportunidade que me deu. Agradeço, também, por todos os ensinamentos, informações cedidas, discussões de ideias e retificações e pela total disponibilidade em me ajudar na realização desta dissertação.

À **Dra Célia Martins**, minha co-orientadora de dissertação, pelo tempo que dedicou a transmitir-me os seus conhecimentos, teóricos e práticos, por todo o apoio e ajuda no laboratório e, essencialmente, por toda a paciência que teve comigo.

Ao **Dr Bruno Gomes**, por toda a disponibilidade e ajuda constantes e pelo seu incentivo no decurso deste trabalho.

A todos os **colegas e colaboradores do CIGMH**, por terem sido muito hospitaleiros desde o primeiro dia, por estarem sempre disponíveis a ajudar e por terem contribuído para que esta etapa fosse tão enriquecedora.

Aos meus **amigos**, pela amizade e pela força que me deram durante todo este trabalho.

Ao **João**, por estar sempre presente e por ser quem é.

À minha **família**, em especial ao meu **pai**, à minha **mãe** e ao meu **irmão**, por todo o apoio incondicional que sempre me deram, toda a força, por nunca me deixarem desistir, por terem sempre uma palavra amiga e por estarem sempre presentes. Muito obrigada por tudo, sem vocês não teria conseguido!

Mais uma vez, muito obrigada a todos.

Parte do trabalho efetuado durante este projeto de dissertação foi publicado na revista Chemico-Biological Interactions:

- Célia Martins, Carolina Doran, Inês C. Silva, Claudia Miranda, José Rueff, António S. Rodrigues, “Myristicin from nutmeg induces apoptosis via the mitochondrial pathway and down regulates genes of the DNA damage response pathways in human leukaemia K562 cells”, Chemico-Biological Interactions, 2014, 218:1-9.

E apresentado no “50th Congress of the European Societies of Toxicology 7th - 10th September 2014 Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, Scotland” em forma de poster:

- Célia Martins, Inês C. Silva, José Rueff, António S. Rodrigues, “Food flavouring myristicin down-regulates genes of the DNA damage response pathways in human leukaemia K562 cells”, 50th Congress of the European Societies of Toxicology, Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, Scotland – 7th to 10th September 2014.

ABSTRACT

Genome methylation pattern is necessary to gene transcription regulation and to the normal cell function. Some of the phytochemicals found in fruits and vegetables have the capacity to modulate gene expression, and can lead to inhibition or reversion of cancer's initial phases, granting them good candidates to chemopreventives. In order to evaluate the mechanisms by which some phytochemicals influence the gene expression, we studied the elemicina, eugenol, and genistein capacity to alter the methylation of the promoter region from important genes for the development of breast cancer, in breast cancer cell line MCF7. Throughout a chronic exposure of 15 days, at low concentrations (10 μ M), the phytochemicals in study haven't shown substantially cytotoxicity. On the other hand, elemicina and eugenol induced signalling mechanisms of DNA double-strand breaks. These two phytochemicals also modulated the methylation pattern of GSTP1 and RASSF1A genes, and miR124-3. These data show for the first time that elemicina and eugenol have modulation action on methylation, at low concentrations, which may lead to the reversion of the initial phases of carcinogenesis through the alteration of methylation patterns in the genes promoter region.

Key-words: diet; phytochemicals; repair, methylation; chronic exposure

RESUMO

O padrão de metilação do genoma é necessário para a regulação da transcrição genética e para o normal funcionamento da célula. Alguns fitoquímicos presentes em frutas e vegetais têm a capacidade de modular a expressão genética, podendo mesmo levar à inibição ou reversão de fases iniciais do cancro, tornando-os bons candidatos a quimiopreventivos. Com o intuito de avaliar os mecanismos pelos quais alguns fitoquímicos influenciam a expressão genética, estudou-se a capacidade da elemicina, do eugenol e da genisteína alterarem a metilação da região promotora de genes importantes no desenvolvimento do cancro da mama, na linha celular de cancro da mama MCF7. Ao longo de uma exposição prolongada de 15 dias, a baixas concentrações (10 μ M), os fitoquímicos em estudo não são substancialmente citotóxicos. Por outro lado, a elemicina e o eugenol induziram mecanismos de sinalização de quebras de cadeia dupla no DNA. Estes dois fitoquímicos também alteraram o padrão de metilação dos genes GSTP1 e RASSF1A e do miR124-3. Estes dados demonstraram, pela primeira vez, que a baixas concentrações os fitoquímicos elemicina e eugenol têm ação modeladora da metilação, podendo ter influência na reversão de fases iniciais da carcinogénese através da alteração dos padrões de metilação da região promotora de genes.

Termos-chave: dieta; cancro; fitoquímicos; exposição prolongada; reparação; metilação

ÍNDICE

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
1. CANCRO DA MAMA	1
1.1. INCIDÊNCIA, MORTALIDADE E PREVALÊNCIA	1
1.2. ETIOLOGIA/FACTORES DE RISCO	2
1.2.1. Factores reprodutivos e genéticos	2
1.2.2. Estilo de vida, dieta e exposição à radiação	3
1.3. DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO	4
1.4. TERAPÊUTICA	5
2. EPIGENÉTICA	5
2.1. METILAÇÃO DO DNA	6
2.2. METILAÇÃO DO DNA E O CANCRO	7
2.3. EPIGENÉTICA E A DIETA	10
3. MECANISMOS CELULARES DE RESPOSTA A LESÕES NO DNA	11
4. FITOQUÍMICOS	13
4.1. FITOQUÍMICOS E O CANCRO	13
4.2. ALQUENILBENZENOS	14
4.2.1. Elemicina	14
4.2.2. Eugenol	15
4.3. GENISTEINA	17
5. OBJECTIVOS	18
CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. MATERIAIS	19
1.1. REAGENTES	19
1.2. FITOQUÍMICOS	19
1.3. MATERIAL COMPLEMENTAR	19
1.4. SOLUÇÕES	20
1.5. LINHAS CELULARES	22
1.5.1. MDA-MB-231	22
1.5.2. MCF7	22
2. MÉTODOS	23
2.1. CULTURA CELULAR	23
2.1.1. Subcultura de células aderentes	23
2.2. TRATAMENTO COM QUÍMICO/EXPOSIÇÃO PROLONGADA	24
2.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MÉTODO DE EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPANO)	24
2.4. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS/NUCLEARES	24

2.4.1. Quantificação de proteínas	25
2.5. EXTRAÇÃO DE DNA	25
2.5.1. Quantificação de DNA	25
2.6. WESTERN BLOT	25
2.7. PCR ESPECÍFICO PARA A METILAÇÃO (MSP)	26
2.7.1. Transformação bissulfito	26
2.7.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	27
CAPÍTULO III – RESULTADOS	31
1. FITOQUÍMICOS E VIABILIDADE CELULAR	31
2. INDICADORES DE GENOTOXICIDADE	32
3. ALTERAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO	34
CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO	39
BIBLIOGRAFIA	45
ANEXOS	53
SECÇÃO I	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 – Incidência do cancro da mama nos Estados Unidos, desde 1975 até 2009 (adaptado de Ban <i>et al.</i> , 2014).	1
Figura I.2 – Risco de desenvolver cancro da mama, tendo em conta a idade (adaptado de Ban <i>et al.</i> , 2014).	2
Figura I.3 – Alterações histológicas na progressão do cancro da mama (adaptado de Cichon <i>et al.</i> , 2010).	4
Figura I.4 – Tipos de modificações epigenéticas (adaptado de Gerhauser <i>et al.</i> , 2012).	6
Figura I.5 – Esquema ilustrativo da metilação do DNA (adaptado de Meeran <i>et al.</i> , 2010).	6
Figura I.6 – Padrão de metilação em A) células normais e B) células cancerígenas (adaptado de Gros <i>et al.</i> , 2012).	8
Figura I.7 – Estrutura química dos inibidores de DNMTs (adaptado de Gros <i>et al.</i> , 2012).	9
Figura I.8 – Diferentes tipos de lesões no DNA, respectivos mecanismos de DDR e proteínas induzidas (adaptado de Lord e Ashworth, 2012).	11
Figura I.9 – Reparação de quebras de dupla cadeia do DNA; A) mecanismo de recombinação não-homóloga (adaptado de Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012); B) mecanismo de reparação homóloga (adaptado de Jekimovs <i>et al.</i> , 2014).	12
Figura I.10 – A) estrutura química (adaptado de De Vincenzi <i>et al.</i> , 2004) e B) fonte natural (adaptado de http://www.natureloveyou.sg) da elemicina.	14
Figura I.11 – A) estrutura química (adaptado de Vidhya e Devaraj, 2011) e B) <i>Eugenia caryophyllus</i> , fonte natural do eugenol (adaptado de Singh <i>et al.</i> , 2014).	15
Figura I.12 – A) estrutura química e B) Glycine max, fonte natural da genisteína (adaptado de Singh <i>et al.</i> , 2013).	17
Figura II.1 – A) Células de cancro de mama MDA-MB-231 em cultura; B) Células de cancro de mama MCF7 em cultura; ambas fotografias foram captadas com um microscópio de inversão de fases (TMS, Nixon) com uma ampliação de 200x.	23
Figura II.2 – Etapas da transformação bissulfito de uma citosina não metilada e de uma citosina metilada (adaptado de Huang <i>et al.</i> , 2010).	27
Figura II.3 – Etapas e resultado de uma MPS (adaptado de Zhang <i>et al.</i> , 2009).	28
Figura III.1 – Variação da viabilidade celular das células MCF7 após incubação com os fitoquímicos A) elemicina, B) eugenol e C) genisteína.	32
Figura III.2 – A) Expressão das proteínas ATM e γ -H2AX; a Lamina B1 foi utilizada como controlo interno; B) Expressão relativa da proteína ATM e C) da proteína γ -H2AX calculada em função das células controlo, tratadas com DMSO (expressão igualada a 1).	33
Figura III.3 – A) Expressão das proteínas Bax e Bcl-xl; a β -Actina foi utilizada como controlo interno; B) Expressão relativa da proteína Bax e C) da proteína Bcl-xl calculada em função das células controlo, tratadas com DMSO (expressão igualada a 1).	34
Figura III.4 – A) Padrão de metilação do gene <i>DAPK1</i> após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteína; B) percentagem de metilação do gene <i>DAPK1</i> após exposição das células MCF7 à elemicina, C) eugenol e D) genisteína.	35

Figura III.5 – A) Padrão de metilação do gene *GSTP1* após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteína; **B)** percentagem de metilação do gene *GSTP1* após exposição das células MCF7 à elemicina, **C)** eugenol e **D)** genisteína. _____ **36**

Figura III.6 – A) Padrão de metilação do gene *RASSF1A* após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteína; **B)** percentagem de metilação do gene *RASSF1A* após exposição das células MCF7 à elemicina, **C)** eugenol e **D)** genisteína. _____ **37**

Figura III.6 – A) Padrão de metilação do *miR124-3* após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteína; **B)** percentagem de metilação do *miR124-3* após exposição das células MCF7 à elemicina, **C)** eugenol e **D)** genisteína. _____ **38**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II.1 – Tampão hipotônico utilizado para a extração de proteínas citoplasmáticas (acertar pH para 7,9). _____	20
Tabela II.2 – Tampão salino utilizado para a extração de proteínas nucleares (acertar pH para 7,9). _____	20
Tabela II.3 – “Laemmli Buffer” 2x utilizado para desnaturar e carregar as amostras no gel de electroforese (acertar pH para 6.8 e armazenar a -20°C). _____	20
Tabela II.4 – Tampão de Electroforese 10x utilizado para electroforese SDS-PAGE (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C). _____	21
Tabela II.5 – Tampão de Transferência 10x utilizado para transferir as proteínas do gel para a membrana PVDF (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C). _____	21
Tabela II.6 – Composição do Tampão TBE 10x utilizado para manter o DNA desprotonado e solúvel em água (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C). _____	21
Tabela II.7 – “Loading Buffer” (10mL) utilizado para manter o DNA desprotonado e solúvel em (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C). _____	21
Tabela II.8 – Verseno 10x utilizado como reagente não-enzimático para a dissociação celular (armazenar a 4°C). _____	22
Tabela II.9 – Lista de anticorpos primários utilizados na técnica Western Blot. _____	26
Tabela II.10 – Sequência dos primers utilizados para a MPS e respetiva temperatura de hibridação utilizada na PCR. M – par de primers específicos para a sequência metilada; NM – par de primers específicos para a sequência não metilada. _____	29
Tabela II.11 – Condições utilizadas no termociclador para a realização da PCR. _____	29
Tabela Anexos.1 – Quantificação de extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares e de DNA e RNA obtidos após exposição prolongada de 15 dias aos fitoquímicos α -asarone, β -asarone, curcumina, elemicina, eugenol, genisteína e miristicina, a uma concentração de 10 μ M, em células de cancro da mama MDA-MB-231. _____	53
Tabela Anexos.2 – Quantificação de extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares e de DNA e RNA obtidos após exposição prolongada de 15 dias aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteína, a uma concentração de 10 μ M, em células de cancro da mama MCF7. _____	54

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

α – alpha

μ – mu

π – pi

θ – theta

∞ – Infinito

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Célsius

γ -H2AX – “H2A Histone Family, Member X” fosforilada na serina 139

BER – “Base Excision Repair” (reparação por excisão de bases)

CpG – —C—phosphate—G—

DNA-PK – “DNA-dependent protein kinase”

DTT – Ditioneitol

EDTA –Ácido etilenodiaminotetracético

EGCG – “Epigallocatechin gallate”

HCl – Ácido clorídrico

HEPES – “4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid”

Her2/neu – “Human Epidermal growth factor Receptor 2”

KCl – Cloreto de potássio

kDa – Kilodalton

KOH – Hidróxido de potássio

M – Molar

mC – Metilcitosina

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

miR – microRNA

MMEJ – “Microhomology-mediated end joining”

MRN – “protein complex consisting of Mre11, Rad50 and Nbs1” (complexo proteico constituído por Mre11, Rad50 e Nbs1)

NaCl – Cloreto de sódio

NER – “Nucleotide Excision Repair” (reparação por excisão de nucleótidos)

PMSF – Fenilmetilsulfonilflúor

SDS – Lauril sulfato de sódio

Ser139 – Serina 139

Ser1981 – Serina 1981

UV – Ultravioleta

V(D)J – “Variable, Diverse, and Joining”

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1. Cancro da Mama

1.1. Incidência, Mortalidade e Prevalência

O cancro da mama é a doença oncológica mais comum em mulheres, tendo-se registado cerca de 1,67 milhões de novos casos diagnosticados em todo o mundo em 2012 (25% dos cancros femininos e 12% de todos os cancros) (Ferlay *et al.*, 2013). No que diz respeito aos países da Europa, as incidências são equivalentes, registando-se cerca de 464000 novos casos diagnosticados em 2012 (29% dos cancros femininos e 13% de todos os cancros) (Ferlay *et al.*, 2013). No entanto, as taxas de incidência variam à escala mundial, sendo mais elevadas em países da América do Norte e da Europa, mas significativamente mais reduzidas em países em desenvolvimento, como países da África e Ásia (Ferlay *et al.*, 2013).

A seguir ao cancro do pulmão, o cancro da mama é a maior causa de morte por patologia neoplásica entre mulheres, contabilizando 198000 mortes (15,4%) por ano nos países desenvolvidos (Desantis *et al.* 2014; Downs-Holmes *et al.*, 2012; Ferlay *et al.*, 2013). Atualmente, estima-se que 1 em cada 8 (12,5%) mulheres será diagnosticada com cancro da mama durante a sua vida (Ban *et al.*, 2014; Downs-Holmes *et al.*, 2012; Eisemann *et al.*, 2013).

Nos Estados Unidos, a incidência do cancro da mama aumentou cerca de 1% a cada ano até 1980, ano em que se denotou um aumento abrupto da incidência provavelmente devido à introdução da mamografia como método de detecção (Ban *et al.*, 2014). Durante os anos 90 não se observou diferenças significativas na incidência, no entanto, por volta de 2000 ocorreu uma ligeira diminuição, o que se pensa ter sido causada pela diminuição na utilização de terapias de substituição hormonal pós-menopausa (Ban *et al.*, 2014). Desde 2004 a incidência do cancro de mama tem-se mantido constante (Figura I.1) (Ban *et al.*, 2014).

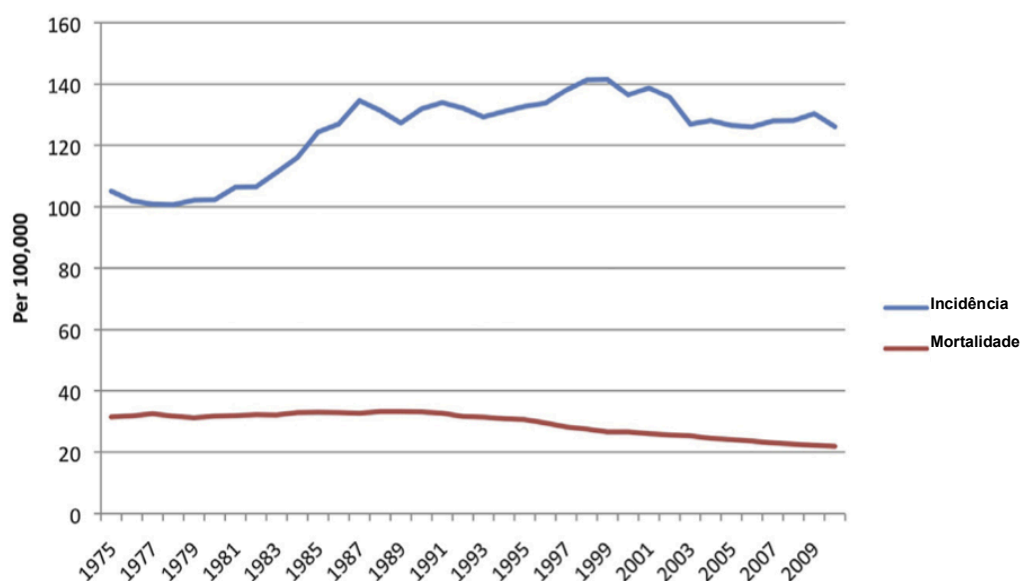


Figura I.1 – Incidência do cancro da mama nos Estados Unidos, desde 1975 até 2009 (adaptado de Ban *et al.*, 2014).

Por outro lado, observa-se que desde de 1990 a taxa de mortalidade tem vindo a diminuir. Sendo que, em comparação com a maioria dos tumores, o cancro da mama tem, hoje em dia, um prognóstico bastante positivo (Eisemann *et al.*, 2013). Segundo o Instituto Nacional de Oncologia dos Estados Unidos, a percentagem de sobrevivência a 5 anos (baseada em dados entre 2004-2010) é de 89,2 (Howlader *et al.*, 2014).

1.2. Etiologia/Factores de Risco

A etiologia do cancro da mama é bastante complexa, uma vez que o seu aparecimento e progressão envolve diversas etapas e a influência de vários factores. Muitos destes factores já são bem conhecidos devido ao elevado número de estudos epidemiológicos realizados até ao momento (Phipps *et al.*, 2011; Yaghjian *et al.*, 2011; Sinicrope *et al.*, 2010; Key *et al.*, 2011). Dentro destes factores de risco estão os reprodutivos, os genéticos, o estilo de vida, a dieta e a exposição à radiação (Ban *et al.*, 2014).

1.2.1. Factores reprodutivos e genéticos

Como ilustra a Figura I.2, o risco de desenvolver cancro da mama aumenta com a idade. A idade precoce da menarca (<12), idade tardia da menopausa (>45), idade tardia da primeira gravidez (>35) e o não ter filhos também aumentam o risco de desenvolver cancro da mama, o que pode ser explicado pelo facto de as mulheres estarem expostas a variações de hormonas endógenas, como o estrogénio, durante um período mais prolongado (Ban *et al.*, 2014; Coughlin e Cypel, 2013). Por outro lado, um maior tempo de amamentação está relacionado com uma redução significativa do risco de desenvolver cancro da mama (Coughlin e Cypel, 2013).

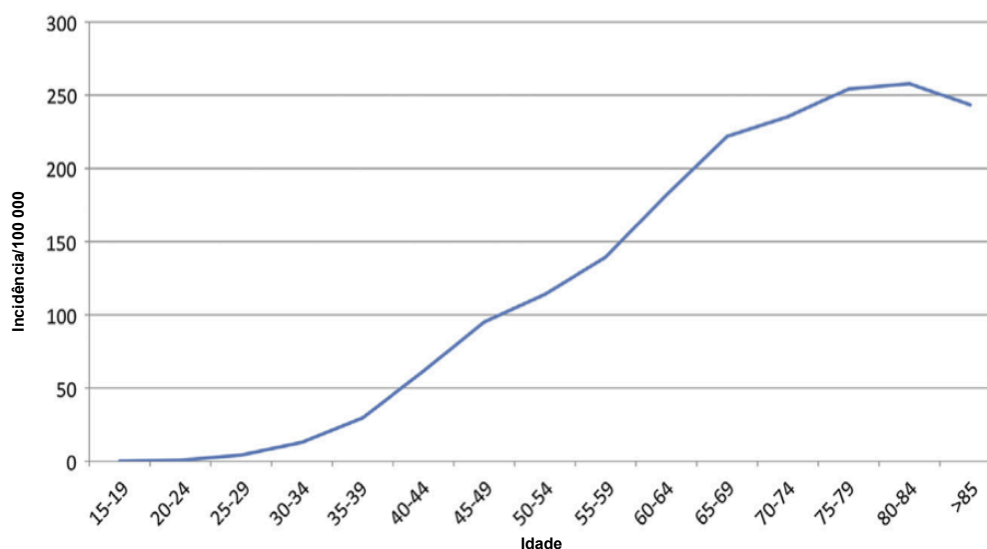


Figura I.2 – Risco de desenvolver cancro da mama, tendo em conta a idade (adaptado de Ban *et al.*, 2014).

No que diz respeito à exposição a hormonas exógenas, a utilização de contraceptivos contendo hormonas (estrogénio e progesterona) parece ter pouca influência no risco associado ao cancro da mama. No entanto, as terapias de substituição hormonal pós-menopausa estão associadas ao aumento de risco dependente da dose e do tempo de exposição (Bakken *et al.*, 2010; Ban *et al.*, 2014).

Através de estudos epidemiológicos baseados em populações e em famílias, diferentes genes têm sido identificados e relacionados com os dois tipos de cancro da mama, esporádico e familiar (Mavaddat *et al.*, 2010). Sabe-se que mulheres com familiares de primeiro grau com cancro da mama têm maior risco de desenvolver cancro da mama, sendo duas vezes superior às mulheres que não têm nenhum caso da doença na família. No entanto, pensa-se que apenas 5 a 10% dos casos de cancro da mama têm origem hereditária (Coughlin e Cypel, 2013). Mutações hereditárias nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por cerca de 15 a 20% dos cancros da mama familiares; mulheres que sejam portadoras destas mutações têm cerca de 60 e 55% de risco, respectivamente, de desenvolver cancro da mama até aos 70 anos (Ban *et al.*, 2014; Coughlin e Cypel, 2013).

Os genes que estão envolvidos na reparação do DNA, regulação do ciclo celular e na manutenção da integridade do genoma podem estar associados com um aumento do risco de desenvolver cancro da mama, como por exemplo o *P53*, *ATM*, *CHEK2*, *PTEN* e *RAD50*. No entanto, nestes casos a penetrância é baixa, sendo que a incidência de mutações nestes genes varia entre 1 a 5% e existem poucos casos de indivíduos homozigóticos diagnosticados com cancro da mama (Ban *et al.*, 2014).

1.2.2. Estilo de vida, dieta e exposição à radiação

A dieta tem influência no risco de desenvolver cancro da mama. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de perceber se determinados compostos presentes na dieta podem ter influência no risco de desenvolver cancro da mama. Alguns desses estudos demonstraram taxas de incidência do cancro da mama mais baixas em regiões onde existe uma elevada ingestão de soja (Ban *et al.*, 2014). Esta diferença pode dever-se ao facto de que alimentos como a fruta e vegetais terem na sua constituição compostos importantes, como as fibras, que se podem ligar a agentes cancerígenos no trato gastrointestinal, os antioxidantes ou as vitaminas, que podem prevenir as lesões oxidativas do DNA (Aune *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2011) e os fitoquímicos, que podem ter um efeito quimiopreventivo.

Por outro lado, o estilo de vida também parece ter efeito neste risco. Mulheres que têm por hábito beber 3 a 4 porções de bebidas alcoólicas por dia têm um risco acrescido de 32% de desenvolver cancro da mama, comparando com mulheres que não ingerem bebidas alcoólicas. Já a prática de atividade física em adulto parece diminuir o risco entre 10 a 50% (Ban *et al.*, 2014; Brooks e Zakhari, 2013).

A exposição à radiação ionizante, incluindo a radiação proveniente de procedimentos médicos (por exemplo, raios-X, tomografias e radioterapia), é um conhecido factor de risco para o desenvolvimento de cancro da mama. A idade de exposição é muito importante, tendo um maior

risco mulheres que tenham sido expostas à radiação numa idade jovem (20 anos ou menos) e um menor risco mulheres que tenham sido expostas depois dos 40 anos (Ban *et al.*, 2014).

1.3. Desenvolvimento e progressão

Do ponto de vista histológico, acredita-se que a grande maioria dos tumores mamários se originam a partir das unidades ducto-lóbulo terminais (Cichon *et al.*, 2010). Posto isto, o modelo de desenvolvimento e progressão do cancro da mama apresentado é baseado nas lesões ductais. Numa fase inicial, as células em proliferação tornam-se monomórficas com núcleos de tamanho similar e com alguns eventos mitóticos, como é possível observar na Figura 1.3B; a taxa de proliferação nas unidade ducto-lóbulo terminais passa de 2% para 5 a 15%. Nesta fase, o tumor é denominado carcinoma ductal *in situ*, pois esta proliferação neoplásica das células (células epiteliais lumbais e células mioepiteliais) não transpõe a membrana basal. Existe a transição de carcinoma ductal *in situ* para carcinoma ductal invasivo quando a membrana basal é clivada e há a invasão dos tecido envolventes e alteração das células (vasos sanguíneos, fibroblastos e macrófagos; Figura 1.3C) (Cichon *et al.*, 2010). Nesta fase, as células tumorais podem migrar para órgãos distantes, levando a metástases (Polyak, 2007)

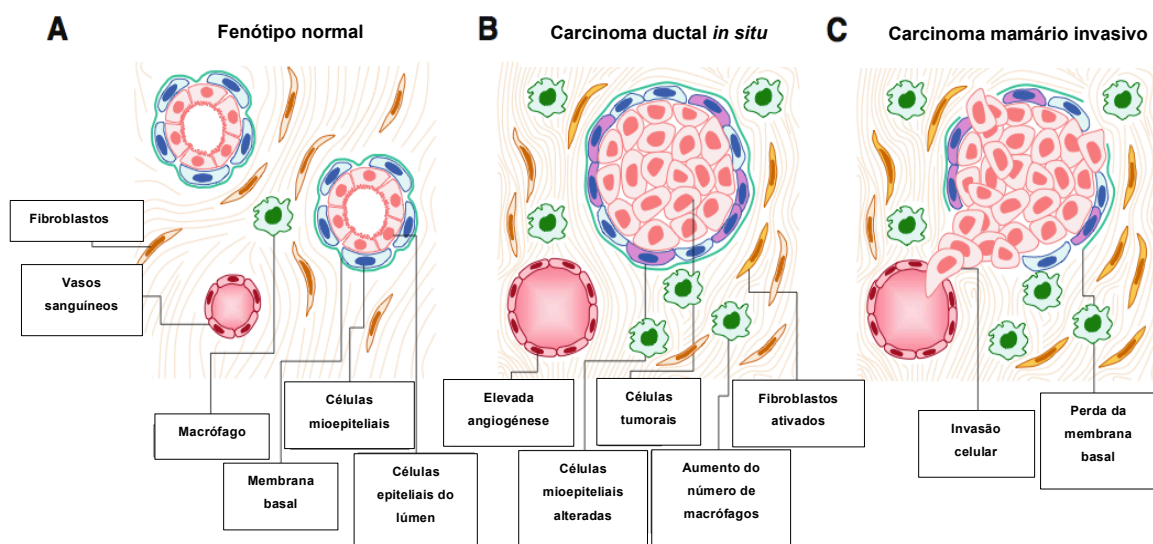


Figura 1.3 – Alterações histológicas na progressão do cancro da mama (adaptado de Cichon *et al.*, 2010).

No que diz respeito à genética do cancro da mama, várias alterações genéticas (como deleções, mutações pontuais e rearranjos cromossómicos) têm sido associadas às fases iniciais da progressão do cancro (Dworkin *et al*, 2009). No entanto, para além destes eventos genéticos bem estudados e conhecidos, tem crescido a evidência de que alterações hereditárias, como modificações epigenéticas, podem resultar em expressões génicas anormais e terem um papel igualmente crucial na iniciação do cancro da mama (Dworkin *et al*, 2009; Polyak, 2007).

1.4. Terapêutica

Nas últimas décadas, os tratamentos mais utilizados na luta contra o cancro têm como objetivo destruir células patologicamente alteradas e, com esse intuito, são administrados fármacos antineoplásicos citotóxicos (Schnekenburger *et al.*, 2014). No entanto, a aquisição de resistência aos fármacos é um dos fatores responsáveis pela falha nos tratamentos do cancro da mama. Por exemplo: atualmente, a maioria dos cancros da mama que são hormono-dependentes (como o Receptor de Estrogénio e Receptor de Progesterona positivo) são tratados com tamoxifeno e fulvestrante. Numa fase inicial do tratamento, cerca de 70% dos pacientes respondem positivamente a este tratamento, no entanto, no decorrer do tratamento cerca de 40% dos pacientes adquirem resistência ao tamoxifeno (Dworkin *et al.*, 2009). Contudo, as razões que levam a esta aquisição de resistência ainda não são conhecidas nem compreendidas e, tendo isto em conta, a solução poderá passar por desenvolver novos fármacos ou terapias que possam reverter a resistência.

É também necessário desenvolver um método específico de diagnóstico, para além da mamografia, que permita a detecção do cancro da mama ainda em fases iniciais; como por exemplo, a detecção de alteração da metilação do DNA no sangue/soro (um teste bioquímico) (Khan *et al.*, 2011). Sabe-se que o gene supressor de tumor “Ras Association (RalGDS/AF-6) Domain Family Member 1” (*RASSF1*) está frequentemente metilado em tecidos de cancro da mama, tendo sido já detectado no carcinoma ductal *in situ*. Outros genes como o *ESR1*, “Glutathione S-transferase P” (*GSTP1*), *RARβ2*, *p16INKa*, “Death-Associated Protein Kinase 1” (*DAPK1*), *Cyclin D2*, *HIN1* e *TWIST* estão, também, hipermetilados no cancro da mama (Huang *et al.*, 2011). As alterações na metilação do DNA podem vir a ser um bom biomarcador para o cancro da mama, pois o DNA é mais estável que o RNA e que as proteínas e pode ser obtido através do sangue, de fluídos no mamilo ou de tecidos tumorais. É evidente que as modificações epigenéticas têm um papel fundamental na iniciação e progressão do cancro da mama e por isso podem vir a ser muito úteis na prevenção, no prognóstico e, talvez, no tratamento deste (Khan *et al.*, 2011).

2. Epigenética

A epigenética refere-se ao estudo de um conjunto de alterações na expressão genética ou no fenótipo da célula, sem interferir com a sequência do DNA e que embora de natureza reversível podem ser hereditárias (Thakur *et al.*, 2013). Estas modificações podem ser a explicação para o facto de, perante o mesmo estímulo ambiental, duas células com genótipos idênticos darem origem a diferentes fenótipos (Sandoval e Esteller, 2012). O padrão epigenético é estabelecido durante a diferenciação celular, sendo mantido durante vários ciclos mitóticos, permitindo a diversidade celular e regulando que informação genética pode ser acedida sem que para tal ocorram alterações na sequência do DNA (Sharma *et al.*, 2010).

Considera-se, até ao momento, quatro tipos de modificações epigenéticas: alterações pós-traducionais de histonas, metilação do DNA, remodelação da cromatina e RNAs não-codificantes (Figura 1.4) (Sandoval e Esteller, 2012).

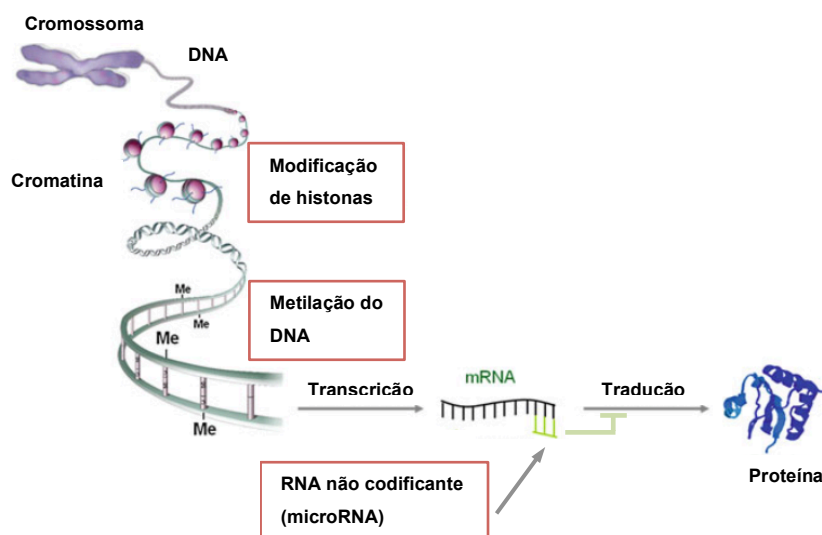


Figura I.4 – Tipos de modificações epigenéticas (adaptado de Gerhauser *et al.*, 2012)

Todas as informações transmitidas pelas modificações epigenéticas têm um papel importante na regulação de processos dependentes do DNA e a existência de padrões epigenéticos anormais pode levar ao desenvolvimento de diversas doenças, como o cancro (Dawson e Kouzarides, 2012).

2.1. Metilação do DNA

Os padrões de metilação são estabelecidos durante as fases iniciais do desenvolvimento e são essenciais para a regulação do desenvolvimento embrionário e da transcrição, estando implicados na repressão de oncogenes, no controlo da expressão de genes essenciais à proliferação e diferenciação celular, no imprinting parental, na inativação do cromossoma X e na preservação da integridade dos cromossomas (Gros *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2001; Stefanska *et al.*, 2012).

A metilação do DNA baseia-se na adição de um grupo metilo (CH_3) ao carbono da posição 5 do anel da pirimidina citosina, localizada predominantemente nos dinucleotídeos citosina e guanina (CpG) do DNA genómico (Stefansson e Esteller, 2013; Supic *et al.*, 2013). Esta reação é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que efetuam a transferência do grupo metilo de S-adenosilmetionina (SAM) para a citosina formando-se S-adenosilhocisteína (SAH), como representa a Figura I.5 (Gerhauser, 2012).

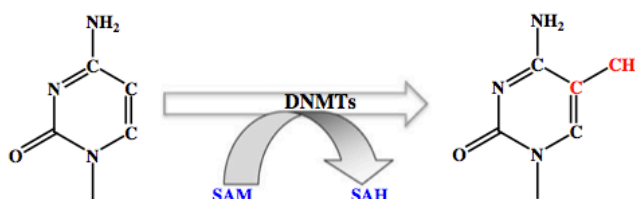


Figura I.5 – Esquema ilustrativo da metilação do DNA (adaptado de Meeran *et al.*, 2010).

Existem 8 DNMTs conhecidas até ao momento: DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L (Nowsheen *et al.*, 2012). A enzima responsável pela manutenção da metilação durante a replicação do DNA é a DNMT1, que atua tendo como molde as cadeias hemimetiladas e realiza a adição de grupos metilo às cadeias a ser sintetizadas; enquanto que a DNMT3a e a DNMT3b são responsáveis pela metilação *de novo*, atuam independentemente da replicação e demonstram igual afinidade para cadeias hemimetiladas ou não-metiladas, sendo altamente expressas durante a embriogénese mas pouco expressas em tecidos adultos (Palii *et al.*, 2008; Nowsheen *et al.*, 2012; Shankar *et al.*, 2013).

Na sua grande maioria, a metilação ocorre em regiões ricas em CG, denominadas ilhas CpG, que se concentram nas regiões promotoras dos genes; nos humanos, cerca de 60% dos genes possuem ilhas CpG nas suas regiões promotoras (Khan *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2010; Stefanska *et al.*, 2012). Em tecidos normais, estas ilhas estão, maioritariamente, não metiladas o que leva a que haja uma transcrição ativa dos genes envolvidos nos processos celulares (Khan *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2001; Stefanska *et al.*, 2012). As ilhas que estão metiladas localizam-se em sequências repetitivas do DNA ribossomal, dos satélites e dos centrómeros, impedindo o acesso de enzimas de transcrição e contribuindo, assim, para a estabilidade cromossómica (Gerhauser, 2012).

2.2. Metilação do DNA e o cancro

O padrão de metilação observado em tecidos normais sofre uma grande modificação no cancro, levando a alterações na regulação da transcrição de inúmeros genes (Sharma *et al.*, 2010). Em células tumorais, as alterações no padrão de metilação ocorrem tão frequentemente como as mutações ou deleções na sequência de DNA, tendo igual influência nas etapas iniciais do desenvolvimento do cancro (Gravina *et al.*, 2010).

O cancro é caracterizado por hipometilação global do DNA, hipermetilação das regiões promotoras de alguns genes e perda de imprinting. A hipometilação global do DNA ocorre maioritariamente em locais genómicos pobres em genes, como elementos repetitivos, retrotransposões, regiões promotoras pobres em ilhas CpG e intrões (Sandoval e Esteller, 2012). Como consequência da perda de metilação nestes locais há um aumento na instabilidade genómica, pois ocorrem rearranjos cromossómicos, translocações para outras regiões genómicas e ativação de proto-oncogenes (Sharma *et al.*, 2010). A hipermetilação das regiões promotoras de genes contribui para a tumorigénese pois leva a repressão da transcrição e perda de função de determinados genes, como ilustra a Figura 1.6 (Sandoval e Esteller, 2012). Os genes mais afectados por esta inibição da transcrição são os supressores de tumores, no entanto muitos outros genes envolvidos na regulação de processos celulares, como angiogénese, metastização, regulação do ciclo celular, apoptose, resistência a fármacos e destoxificação, também podem ser afetados por este mecanismo (Sharma *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014).

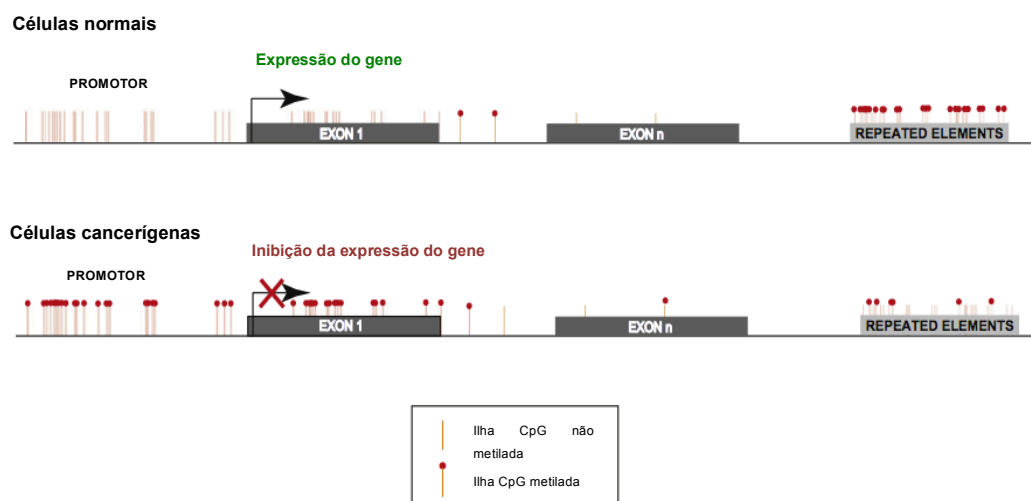


Figura I.6 – Padrão de metilação em A) células normais e B) células cancerígenas (adaptado de Gros et al., 2012).

A hipermetilação do DNA leva à repressão da transcrição por duas vias. Uma das vias envolve a ligação de proteínas ao grupo metilo do DNA metilado, o que leva ao recrutamento de histonas deacetilases que provocam o aumento da afinidade das histonas para o DNA, levando à compactação dos nucleossomas – heterocromatina; este processo torna a cromatina transcricionalmente inacessível, fazendo com que haja uma reduzida acessibilidade para os factores de transcrição se ligarem à cadeia de DNA impedindo a transcrição; a reativação da transcrição dos genes envolve a descondensação da cromatina – eucromatina (Foulks *et al.*, 2012; Shankar *et al.*, 2013). A outra via baseia-se apenas no facto de que a metilação do DNA inibe a ligação direta de alguns factores de transcrição (como por exemplo E2F e c-Myc) (Meeran *et al.*, 2010).

Apesar da metilação ser a modificação epigenética mais estudada, ainda pouco se sabe sobre quais os efeitos da metilação quando ocorre fora das ilhas CpG e o motivo pelo qual apenas determinados genes são sinalizados para serem silenciados através da metilação do DNA. Especula-se que a especificidade dos genes metilados forneça alguma vantagem às células, resultando na sua sinalização para a metilação (Portela e Esteller, 2010; Sharma *et al.*, 2010).

Devido à natureza reversível das modificações epigenéticas e ao facto de ocorrerem em fases iniciais da carcinogénese, têm sido realizados estudos com o intuito de introduzir a terapia epigenética tanto como um tratamento do cancro quer como preventivo (Schnekenburger *et al.*, 2014). O objetivo desta terapêutica é restaurar o padrão epigenético nas células cancerígenas, fazendo com que muitas funções da célula sejam restabelecidas (Sharma *et al.*, 2010).

Vários fármacos têm vindo a ser desenvolvidos, na sua grande maioria análogos de nucleósidos, como os inibidores de DNMTs 5'-azacytidine (azacitidine) e 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine; DAC) (Figura I.7), que atuam por incorporação no DNA (Sharma *et al.*, 2010).

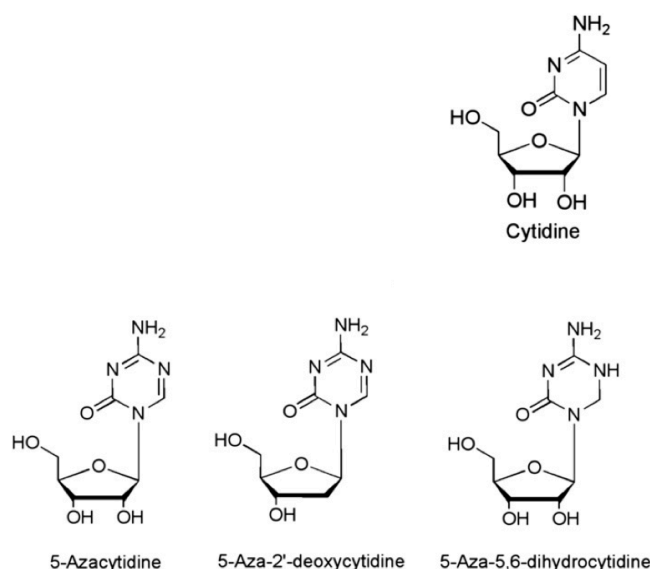


Figura 1.7 – Estrutura química dos inibidores de DNMTs (adaptado de Gros *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação destes análogos de nucleosídeos é um processo de várias etapas: o DAC é metabolizado *in vivo*, sendo fosforilado a 5-azadCTP (5-Aza-2'-deoxy-cytidine-5'-triphosphate) e incorporado no DNA durante a replicação. Como resultado da reação da transferência do grupo metil, a DNMT fica covalentemente ligada ao DNA, criando uma ligação proteína-DNA, levando à diminuição dos níveis de proteína DNMT solúvel, o que induz desmetilação e reativação de genes (Orta *et al.*, 2013). Apesar do mecanismo de desmetilação estar bem estudado, pouco se sabe sobre como estes fármacos levam à morte celular. Existem dois modelos que tentam explicar este mecanismo *in vivo*: um modelo baseia-se na reativação de genes silenciados que levam à paragem do ciclo celular e/ou apoptose; o outro modelo está relacionado com a formação de aductos covalentes entre a DNMT e o DNA, o que leva a lesões no DNA e citotoxicidade (Orta *et al.*, 2013; Palii *et al.*, 2008). Estes fármacos já têm aprovação pela “Food and Drug Administration” (FDA) e são atualmente utilizados no tratamento da Síndrome Mielodisplásica (Foulks *et al.*, 2012).

Apesar dos resultados promissores, a utilização de inibidores de DNMTs pode ter uma consequência nefasta: ativar a transcrição de genes que estavam inicialmente metilados, como proto-oncogenes (Yang *et al.*, 2001). Além disso, os ensaios clínicos demonstram que os inibidores de DNMTs têm uma baixa atividade anticancerígena *per se* e induzem uma toxicidade significativa. Novos fármacos, como o CP-4200 e o SGI-110, estão já em fase de ensaios clínicos; no entanto a inespecificidade e os elevados efeitos secundários que causam demonstram a necessidade em desenvolver inibidores de DNMTs mais seletivos (Gros *et al.*, 2012).

A utilização de inibidores de DNMTs continua a levantar várias questões sobre o seu efeito nas células não-cancerígenas. Existem muitas dúvidas tanto acerca da sua segurança numa utilização a longo prazo como sobre o seu potencial carcinogénico e mutagénico. No entanto, estudos recentes sugerem que as células normais interagem de uma forma diferente com os inibidores de DNMTs. Uma vez que se dividem a uma taxa muito menor do que as células cancerígenas, as células normais integram uma menor quantidade de fármaco no seu DNA diminuindo assim o efeito citotóxico (Gravina *et al.*, 2010).

Os compostos naturais podem vir a ser uma alternativa à terapia convencional contra o cancro, nomeadamente enquanto inibidores de DNMTs, pois podem ser menos citotóxicos e induzir menos efeitos secundários. Já se sabe que os compostos naturais modulam fatores de transcrição, fatores de crescimento, fatores de sobrevivência celular, vias inflamatórias, invasão e angiogénese o que leva à inibição ou reversão de fases iniciais da carcinogénese como já foi demonstrado em vários modelos experimentais (Dandawate *et al.*, 2013; Lewandowska *et al.* 2014; Martins *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2012).

2.3. Epigenética e a dieta

Os padrões epigenéticos são constantemente modificados por factores externos e por alterações no ambiente (Medina-Franco *et al.*, 2011). Contudo, a natureza reversível das modificações epigenéticas permite ao organismo responder às alterações na dieta, na exposição a toxinas e na radiação UV, entre outras (Huang *et al.*, 2011). Compostos naturais presentes nas frutas, vegetais e especiarias têm demonstrado ter um papel relevante na prevenção ou modulação de alterações epigenéticas e, consequentemente, na regulação de funções celulares, modificando o risco de desenvolver cancro (Mirza *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2013). Vários compostos naturais, como o EGCG, a genisteína e o resveratrol, foram já descritos como potenciais reguladores das DNMTs e das enzimas modificadoras de histonas, levando ao restauro da expressão de muitos genes supressores de tumores (Lee *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2014)

O tratamento de células humanas de carcinoma epidermóide (A431) com EGCG levou à desmetilação global do genoma, diminuindo os níveis de 5-mC, da atividade das DNMTs e das proteínas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A exposição ao EGCG resultou, também, na reexpressão de mRNA e proteínas de genes supressores de tumor que estavam silenciados, como *p16INK4a* e *CIP1/p21* (Lee *et al.*, 2013; Nandakumar *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstraram que a genisteína diminui a metilação de determinados genes supressores de tumores, como *BRCA1*, *BRCA2* e *GSTP1*, em células de cancro da mama (Xie *et al.*, 2014). Foi também descrito que o EGCG e a genisteína restauraram a expressão de genes silenciados por metilação do DNA, através da sub-regulação da DNMT1 (Mirza *et al.*, 2013). A exposição de linhas celulares de cancro cervical à curcumina levou à reversão da hipermetilação das ilhas CpG, ativando o gene *RARβ2* (Su *et al.*, 2012). Igualmente, a exposição de células de cancro da próstata de ratinho (células TRAMP C1) à curcumina levou à redução do nível de metilação de ilhas CpG do gene *Nrf2*, reativando a sua expressão (Lee *et al.*, 2013). A utilização de compostos naturais como agentes modulares dos padrões epigenéticos representa uma abordagem revolucionária no campo da quimioprevenção e pode vir a fornecer uma via para a inibição ou reversão do cancro nas fases iniciais da carcinogénese (Su *et al.*, 2012).

3. Mecanismos celulares de resposta a lesões no DNA

A divisão celular é o mecanismo através do qual uma célula dá origem a duas células iguais e constitui um processo de duas fases: mitose e interfase. A mitose está dividida em profase, metafase, anafase e telofase, e a interfase divide-se em G1, S e G2 (Vermeulen *et al.*, 2003). A passagem de uma fase do ciclo celular para outra é regulada por proteínas denominadas de cinases dependentes de ciclinas (CDK). Estas proteínas, como o nome indica, são ativadas pelas ciclinas cujos níveis aumentam e diminuem durante o ciclo celular, uma vez que diferentes ciclinas são necessárias para ativar diferentes CDKs (Vermeulen *et al.*, 2003). A progressão no ciclo celular é controlada em pontos específicos, denominados “checkpoints”, onde a integridade do DNA é verificada e assegurada (Kastan e Bartek, 2004). Em resposta a lesões no DNA, os “checkpoints” interrompem o ciclo celular e fornecem tempo à célula para reparar os erros existentes (Vermeulen *et al.*, 2003). Os “checkpoints” estão situados na passagem G1/S, na passagem G2/M e durante a fase M (Vermeulen *et al.*, 2003). Falhas nos “checkpoints” durante o ciclo celular podem levar a mutações nos genes, lesões nos cromossomas e aneuploidia (Pietenpol e Stewart, 2002).

As células estão diariamente e continuamente a ser afetadas por agentes que alteram a integridade do DNA. Estes agentes podem formar-se a partir de processos fisiológicos endógenos, como espécies reativas de oxigénio e azoto; ou podem ser agentes exógenos, como raios ultravioleta (da luz solar), radiação ionizante, fumo do tabaco ou fármacos utilizados na quimioterapia (como a cisplatina que induz ligações covalentes intercatenárias entre bases do DNA ou a camptotecina que se ligam às topoisomerasas no DNA e causa quebras de cadeia simples e dupla) (Lord e Ashworth, 2012). De forma a manter a estabilidade genética e a corrigir as lesões no DNA, as células possuem mecanismos que detetam, sinalizam e promovem a sua reparação; a ação coletiva destes mecanismos é denominada “resposta a lesões no DNA” (DDR). Uma vez que as lesões no DNA são de vários tipos, existem vários mecanismos de DDR que ativam cascatas de proteínas distintas (Figura I.8).

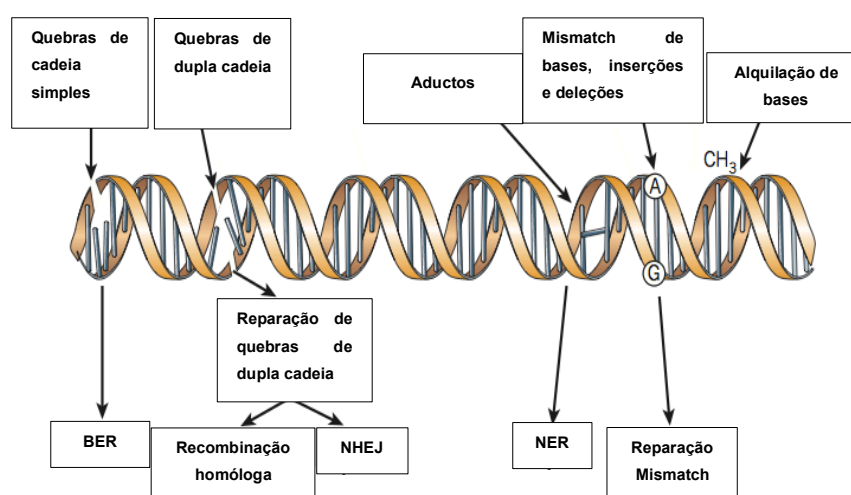


Figura I.8 – Diferentes tipos de lesões no DNA, respectivos mecanismos de DDR e proteínas induzidas (adaptado de Lord e Ashworth, 2012).

As quebras de dupla cadeia (DSBs) são as mais perigosas, e podem levar a rearranjos cromossômicos, deleções ou outras mutações que causam instabilidade no genoma se não forem corretamente corrigidas. As DSBs podem ser reparadas por dois mecanismos: recombinação não-homóloga (NHEJ) e recombinação homóloga (HR) (Scully e Xie, 2013). A NHEJ pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, no entanto tem a desvantagem de ser um mecanismo propenso a erros. A sinalização da DSB, neste mecanismo, é realizada por um heterodímero (proteínas Ku70 e Ku80) que recruta as proteínas responsáveis pela remoção da lesão do DNA e pela junção das duas extremidades (Figura I.9A) (Halaby e Hakem, 2011; Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012). A HR é o mecanismo responsável por reparar DSBs durante as fases S e G2, uma vez que necessita que a cromátide irmã (que não sofreu lesão) esteja acessível para ser utilizada como molde para a síntese da nova cadeia de DNA; isto faz com que este mecanismo seja livre de erros. A sinalização que desencadeia este mecanismo tem início com o recrutamento do complexo MRN para a DSB, o que leva à fosforilação de “Ataxia telangiectasia mutated” (ATM) na Ser1981. Uma das funções do ATM é fosforilar a histona “H2A histone family member X” (H2AX) na Ser139, formando γ -H2AX. A formação de γ -H2AX é um acontecimento chave para o recrutamento das proteínas efectoras necessárias para a paragem do ciclo celular e para a reparação do DNA (Figura I.9B) (Halaby e Hakem, 2011; Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012).

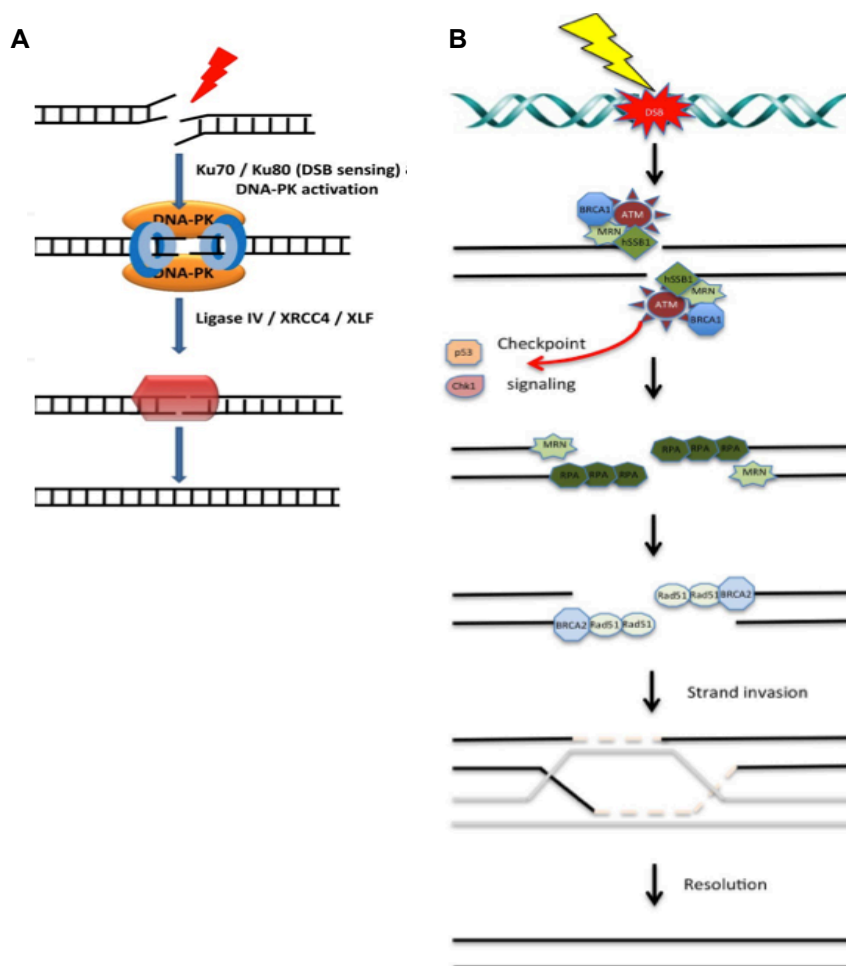


Figura I.9 – Reparação de quebras de dupla cadeia do DNA; A) mecanismo de recombinação não-homóloga (adaptado de Lopez-Contreras e Fernandez-Capetillo, 2012); B) mecanismo de reparação homóloga (adaptado de Jekimovs *et al.*, 2014).

Os mecanismos de morte celular são induzidos em último recurso, por exemplo se célula não conseguir reparar uma lesão, se essa reparação for deficiente ou se existir uma grande quantidade de lesões (Fulda *et al.*, 2010). Existem cinco vias diferentes que levam à morte celular: necrose, autofagia, senescência, catástrofe mitótica e apoptose (Fragkos e Beard, 2011; Fulda *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). A apoptose é um mecanismo de morte celular programada e desempenha um papel fundamental na homeostase dos tecidos e no desenvolvimento (Jin e El-Deiry, 2005). Este mecanismo pode ser ativado por duas vias distintas. A via intrínseca da apoptose é ativada por escassez de fatores de crescimento, lesões no DNA ou stress oxidativo (Jin e El-Deiry, 2005). Em resposta a estes estímulos, proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2 (como por exemplo a “Bcl-2-associated X protein” (Bax)) são ativadas e transportadas para a membrana mitocondrial externa, onde são responsáveis pela permeabilização da membrana mitocondrial o que leva à libertação de proteínas pro-apoptóticas para o citoplasma. No citoplasma, estas proteínas pro-apoptóticas interagem com outras proteínas e pro-caspases, o que desencadeia uma cascata de ativação de caspases que culminam na apoptose (Choudhury *et al.*, 2012). A via apoptótica extrínseca é desencadeada pela ligação de moléculas pró-apoptóticas aos respetivos receptores. Isto leva ao recrutamento de proteínas e da caspase-8 o que leva à ativação da cascata de caspases que culminam na apoptose (Jin e El-Deiry, 2005). A falha na regulação da apoptose leva ao desenvolvimento de patologias como doenças auto-imunes, neurodegeneração ou cancro (Jin e El-Deiry, 2005).

4. Fitoquímicos

4.1. Fitoquímicos e o cancro

Uma dieta rica em frutas e vegetais é considerada benéfica para a saúde e pode, até, reduzir a incidência de cancro devido à combinação dos seus múltiplos efeitos, como a atividade anti-inflamatória, anti-oxidante, pro-apoptótica, pro-diferenciação, anti-angiogénica e anti-invasiva (Schnekenburger *et al.*, 2014). As frutas, vegetais e especiarias presentes nas dietas são constituídos por vários fitoquímicos que lhes são intrínsecos, sendo estes constituídos por componentes bioativos, como polifenóis, alcalóides e vitaminas, que para além da sua função básica de nutrição podem ter efeitos anti-cancerígenos (Meeran *et al.*, 2010). No entanto a grande dúvida assenta sobre qual a substância que é responsável e através de que mecanismo molecular há a supressão do cancro (Singh *et al.*, 2014). Fitoquímicos como as catequinas da família dos polifenóis (provenientes do chá verde), a curcumina (proveniente do tumérulo), a genisteína (proveniente das sementes de soja), o ácido rosmarínico (proveniente do rosmaninho) e o resveratrol (proveniente das bagas de uvas) têm demonstrado o seu efeito na prevenção do cancro através de modificações genéticas e epigenéticas (Meeran *et al.*, 2010). Posto isto, vários estudos têm sido realizados com o intuito de tentar perceber se alguns fitoquímicos exercem o seu efeito anti-cancerígeno por metilação do DNA (Supic *et al.*, 2013). Sabe-se que vários fitoquímicos são importantes fontes de grupos metilo, necessários à síntese de SAM e que podem inibir diretamente as DNMTs, alterando os seus níveis basais, podendo ter a capacidade de alterar padrões de metilação (Ong *et al.*, 2012). Como por exemplo, o componente principal do chá verde (EGCG) conjuga-se com as DNMTs e leva à

redução da metilação em células tumorais, tendo uma possível ação preventiva do cancro (Meeran *et al.*, 2010). O mesmo mecanismo observa-se na genisteína, na curcumina e no resveratrol (Ong *et al.*, 2012). Um outro exemplo é o folato que após a ingestão é convertido e leva a um aumento nos níveis de SAH, que é um inibidor das reações de metilação (Stefanska *et al.*, 2012). Outros fitoquímicos como a baicalina, a miricetina, o ácido protocatecuico, o ácido sináptico, o resveratrol, o ácido rosmarínico, o ácido elágico, a betanina, a cianidina e a galangina têm sido estudados para analisar o seu potencial efeito nas DNMTs em células de cancro da mama (MCF7). O ácido rosmarínico demonstrou ser o inibidor mais potente das DNMTs, no entanto nenhum dos fitoquímicos em estudo teve efeito na metilação dos genes *RASSF1A*, *GSTP1* ou *HIN1* (Khan *et al.*, 2011).

O contributo dos compostos naturais no desenvolvimento de fármacos é bem conhecido e a sua utilização remonta a épocas antigas em que misturas de plantas eram feitas para tratar vários problemas de saúde (Tapsell *et al.*, 2006). Na atualidade, estima-se que mais de 60% dos fármacos utilizados no tratamento do cancro são derivados de fontes naturais (Medina-Franco *et al.*, 2011). A utilização de fitoquímicos tem várias vantagens: são considerados seguros (não genotóxicos e não citotóxicos) uma vez que fazem parte dos alimentos, estão disponíveis para a maioria dos indivíduos e exercem o seu efeito a concentrações consideradas baixas (Khan *et al.*, 2011). Contudo, apesar dos vários estudos que têm sido realizados nesta área, várias questões continuam a surgir: até que dose pode o fitoquímico ser administrado sem que tenha associado um efeito citotóxico? O fitoquímico pode ser administrado em doses repetidas? De quanto tempo devem ser os tratamentos? O fitoquímico tem o seu máximo efeito sozinho, ou deve ser administrado em combinação com outros fármacos? (Gros *et al.*, 2012).

4.2. Alquenilbenzenos

4.2.1. Elemicina

A elemicina (1,2,3-trimethoxy-5-allylbenzene; CAS nº: 487-11-6) (Figura I.10A) está presente no óleo de várias plantas aromáticas, como a salsa (*Petroselinum sativum*) onde a percentagem de elemicina presente é de 4,6, a noz-moscada (*Myristica fragrans*) com 0,3 a 7,5% deste fitoquímico e na resina da árvore Elemi (*Canarium commune*) que contem 2,5 a 10,6% de elemicina (Figura I.10B) (van den Berg *et al.*, 2012; De Vincenzi *et al.*, 2004).

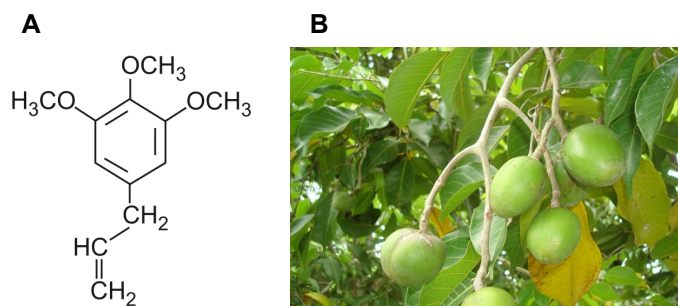


Figura I.10 – **A)** estrutura química (adaptado de De Vincenzi *et al.*, 2004) e **B)** fonte natural (adaptado de <http://www.natureloveyou.sg>) da elemicina.

Em 2008, a “Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives” (JECFA) concluiu que eram necessários mais estudos para determinar o potencial risco da exposição diária, através de alimentos e especiarias, à elemicina na saúde humana (van den Berg *et al.*, 2012). A capacidade antiviral da elemicina foi estudada por Sajjadi e seus colaboradores, onde observaram que este alquenilbenzeno tem um efeito anti Herpes Simplex vírus (HSV) significativa e não mostrou ter nenhum efeito citotóxico, em células de rim de macaco verde africano (Vero). Posto isto, os autores concluíram que os efeitos antibacterianos e antifúngicos são os mais proeminentes deste fitoquímico (Sajjadi *et al.*, 2012). Por outro lado, a elemicina mostrou não possuir atividade hepatocarcinogénica quando administrada a uma concentração de 4,75µmol/ratinho, em ratinhos macho (Miller *et al.*, 1983). Através de modelos de destoxificação e biotransformação para ratinhos e humanos (modelos de cinética baseado na fisiologia – PBK), foi demonstrado que a exposição diária à elemicina é de baixa prioridade para a gestão do risco na saúde humana, comparitivamente ao estragole e ao safrole, que são também alquenilbenzenos (van den Berg *et al.*, 2012). No entanto, poucos estudos foram realizados com a elemicina e, como consequência, pouco se sabe sobre o seu modo de ação, quais os seus alvos moleculares, se detêm efeito citotóxico ou genotóxico e qual o seu efeito no padrão epigenético das células.

4.2.2. Eugenol

O eugenol (1-allyl-3-methoxy-4-hydroxybenzene; CAS N°: 97-53-0) (Figura I.11A) é um fitoquímico que está presente, maioritariamente, na planta aromática cravinho (*Eugenia caryophyllus*) (Figura I.11B) (Vidhya e Devaraj, 2011). Esta planta aromática é amplamente cultivada na Indonésia, Madagascar, Índia e Sri Lanka. Adicionalmente, plantas como *Cinnamomum tamala*, *Myristica fragrans*, *Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Ocimum tenuiflorum*, *Illicium anisatum* e *Cinnamomum verum* também contêm eugenol (Jaganathan e Supriyanto, 2012).

Este alquenilbenzeno tem várias aplicações, por exemplo: é utilizado em países da Ásia como antisséptico medicinal, analgésico e antibacteriano e é, também, utilizado como aromatizante em cosméticos e produtos alimentares (Jaganathan e Supriyanto, 2012; Vidhya e Devaraj, 2011). O eugenol é atualmente muito utilizado nos cimentos temporários e outros materiais, na medicina dentária (Kobayashi *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2014). A entidade reguladora FDA considerou o eugenol como seguro para a saúde, sendo não carcinogénico e não mutagénico. Além disso, tanto a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) como a Organização Mundial de Saúde (WHO) determinaram que uma ingestão de 2,5 mg/kg de eugenol por dia era considerada aceitável para os humanos (Jaganathan e Supriyanto, 2012; Vidhya e Devaraj, 2011).

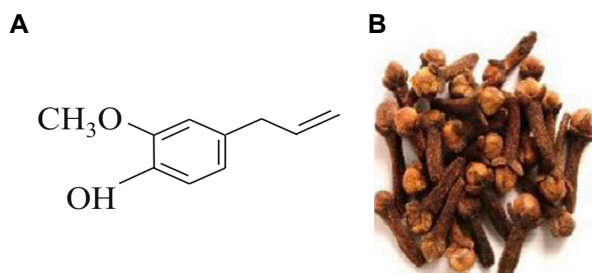


Figura I.11 – A) estrutura química (adaptado de Vidhya e Devaraj, 2011) e **B)** *Eugenia caryophyllus*, fonte natural do eugenol (adaptado de Singh *et al.*, 2014).

As propriedades e funções do eugenol têm sido amplamente estudadas e descritas e sabe-se que, entre outras, o eugenol possui características antivirais, antioxidantes e anti-inflamatórias. Normalmente, atua como agente antioxidante e anti-inflamatório a baixas concentrações; por outro lado, quando em elevadas concentrações, atua como pro-oxidante, causando um aumento na formação de radicais livres que levam a lesões nos tecidos (Jaganathan e Supriyanto, 2012).

Em estudos *in vitro*, foi observado que o eugenol é biotransformado num metabolito reativo, que por sua vez forma rapidamente aductos com o DNA (Bodell *et al.*, 1998; Thompson e Norbeck, 1989). Este alquenilbenzeno induz aberrações cromossômicas em células de hamster chinês (V79), principalmente na presença do sistema de ativação metabólica exógeno S9-mix, a concentrações superiores a 100 µM; o que levou Maralhas e seus colaboradores a concluir que os metabolitos reativos originários da biotransformação do eugenol são os responsáveis pela indução das aberrações cromossômicas (Maralhas *et al.*, 2006).

Estudos de genotoxicidade demonstraram que o eugenol induz quebras de dupla cadeia no DNA, em linhas celulares de ovário de hamster chinês (AA8), na ausência de qualquer sistema de biotransformação exógeno (Martins *et al.*, 2011). Igualmente, foi já demonstrado que o eugenol induz a apoptose, em células de leucemia mielóide aguda (HL-60) e em linhas celulares de ovário de hamster chinês (AA8 e EM9), através da formação de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez levam à permeabilização da membrana externa da mitocôndria, libertando-se o citocromo c para o citoplasma. O eugenol produz, também, fragmentação do DNA, evento que também está associado à apoptose (Martins *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2005).

Em termos mecânicos, o eugenol bloqueia o ciclo celular na fase de replicação para ser possível à célula reparar as lesões no DNA. Após esta paragem, as células re-entram no ciclo celular ou ativam a apoptose. Ghosh e seus colaboradores observaram este mecanismo em células de melanoma, onde após a sua exposição ao eugenol sofreram paragem do ciclo celular na fase S e posteriormente ocorreu apoptose (Ghosh *et al.*, 2005).

Vidhya e Devaraj mostraram que o tratamento de células de cancro da mama (MCF7) com eugenol inibiu a sua proliferação e induziu a apoptose, de uma forma dependente da dose. O tratamento com o eugenol alterou o estado redox intracelular pela diminuição dos níveis de glutatióno através de conjugação, o que corrobora a ação do eugenol como um agente quimiopreventivo (Vidhya e Devaraj, 2011). No entanto, pouco se sabe sobre o efeito do eugenol na epigenética.

4.3. Genisteína

A genisteína (4',5,7-trihydroxyisoflavone; CAS nº: 446-72-0) (Figura I.12A) é a principal isoflavona existente nas sementes de soja (*Glycine max*) (Figura I.12B). Este fitoquímico tem efeitos na inibição do stress oxidativo e da angiogénese, na regulação do ciclo celular e na indução da apoptose (Schnekenburger *et al.*, 2014). Estudos recentes indicaram que a genisteína está envolvida na regulação da expressão génica e no silenciamento de genes através da alteração de eventos epigenéticos, como a metilação do DNA e/ou a modificação das histonas (Shankar *et al.*, 2013).

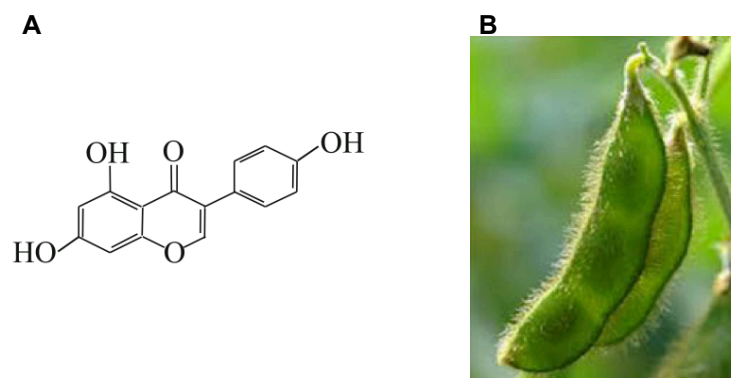


Figura I.12 – A) estrutura química e **B)** *Glycine max*, fonte natural da genisteína (adaptado de Singh *et al.*, 2013).

Supõem-se que o mecanismo de ação dos flavonoides se baseia na inibição indireta das DNMTs. Especificamente: os flavonoides são substratos da catecol O-metiltransferase (COMT), uma enzima que é dependente de SAM; sendo assim, quando os flavonoides são metilados a concentração de SAH aumenta; uma vez que o SAH é um potente inibidor de DNMTs, o seu aumento leva a que as DNMTs deixem de ter a capacidade de realizar a metilação (Gros *et al.*, 2012). No seu estudo, King-Batoon e seus colaboradores corroboraram esta teoria, demonstrando que a genisteína, presente em concentrações baixas, desmetilou parcialmente a região promotora do gene *GSTP1*, reativando a sua expressão em células de cancro da mama (King-Batoon *et al.*, 2008). Num outro estudo, observou-se que a genisteína reverteu a hipermetilação dos genes *RARβ*, *p16* e *MGMT*, levando à sua reativação em células de cancro do esófago (células KYSE 510) (Fang *et al.*, 2005). O gene supressor de tumor *BTG3* mostrou, também, ser desmetilado e reativado pela genisteína em células de cancro da próstata (LNCaP), como descrevem Majid e seus colaboradores (Majid *et al.*, 2010). Além disso, estes autores observam que a genisteína tem efeitos semelhantes ao 5-aza-2'-deoxycytidine. Por outro lado, foi observado que a genisteína exerce a sua função anti-cancerígena predominantemente em fases iniciais do desenvolvimento do cancro da mama (Li *et al.*, 2013).

5. Objectivos

A exposição humana aos fitoquímicos é considerável pois estes estão presentes em chás, especiarias, vegetais, frutas e plantas aromáticas e são cada vez mais utilizados na medicina tradicional e complementar. Nas últimas décadas inúmeros grupos de investigação debruçaram-se sobre o estudo dos efeitos dos fitoquímicos nos humanos, tanto *in vitro* (através de linhas celulares) como *in vivo* (através da utilização de organismos modelo). Com estes estudos, foi possível compreender o efeito dos fitoquímicos em diversos processos da integridade celular, como no controlo do ciclo celular, na apoptose, nas vias de sobrevivência celular, na migração celular e na metastização. Foi, também, possível avaliar o seu efeito na modulação da epigenética e, como consequência, na iniciação de processos cancerígenos. No entanto, pouco foi estudado sobre o efeito da exposição prolongada aos fitoquímicos. A maior parte, senão a totalidade, dos estudos com fitoquímicos envolvem exposições agudas, que não excedem 48-72 horas; desta forma há uma falta de informação sobre os efeitos biológicos associadas a exposições mais prolongadas (semanas a meses) a fitoquímicos. Por outro lado, a maior parte destes estudos faz uso de doses elevadas, longe das concentrações plasmáticas mais baixas encontradas em humanos, na ordem dos 1-10 μM .

Assim, numa primeira fase deste trabalho, o objetivo foi averiguar se um conjunto de fitoquímicos, incluindo a elemicina, eugenol e genisteína tinham efeitos citotóxicos ou genotóxicos associados ao longo de 15 dias de exposição contínua, a uma concentração baixa (10 μM), em duas linhas celulares de cancro da mama, uma tumoral (MCF-7) e uma tumoral metastática (MDA-MB-231). Posteriormente, sendo este o principal objetivo do trabalho, avaliou-se a capacidade destes fitoquímicos de modelar o padrão de metilação de genes envolvidos na tumorigenese.

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Reagentes

Os reagentes ácido bórico, β -Mercaptoetanol, brometo de etídeo, *cocktail* de inibidores de fosfatases, DMEM D6046, DMSO, EDTA, FBS, HEPES, insulina, KOH, PBS, penicilina-estreptomicina, PMSF, tripsina, Tris HCl, Trizma Base, foram adquiridos através da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Etanol, glicerol, KCl, metanol, NaCl foram obtidos da Merck KGaA (Darmstadt, Germany). O *Cocktail* com inibidores de proteases foi obtido através da Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). O nonidet P-40 foi adquirido da USB Corporation (Cleveland, OH, USA). A agarose e o marcador de peso molecular – HyperLadder V – foram adquiridos através da BioLine (London, UK). A glicina foi obtida da CALBIOCHEM (Merck KGaA of Darmstadt, Germany). O vermelho de fenol foi adquirido através da AppliChem (Gatersleben, Saxony-Anhalt, Germany). A BSA e o SDS foram obtidos através da Bio-Rad Laboratories, Inc. (München, Germany). O azul de tripano foi obtido da Gibco. Todos os outros reagentes não determinados foram obtidos pela Merck, caso ocorra diferentes fornecedores, serão identificados ao longo da descrição dos métodos.

1.2. Fitoquímicos

O α -Asarone, o β -Asarone, a curcumina, o eugenol, a genisteína e a miristicina foram adquiridos através da Sigma-Aldrich. A elemicina foi adquirido através da Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada).

1.3. Material complementar

O kit para quantificação de proteínas “Bio-Rad Protein Assay dye” foi obtido através da Bio-Rad Laboratories, Inc. (München, Germany). O mini-kit “AllPrep DNA/RNA Mini Kit” foi obtido através da QIAGEN (SA Biosciences). O kit “EZ DNA Methylation-Gold™ Kit” foi adquirido da Zymo Research Corp. (Irvine, CA, U.S.A.). Os géis de eletroforese “Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels” foram obtidos da Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA). Os kits de Western Blot “WesternDot™ 625 Goat Anti-Mouse Western Blot Kit” e “WesternDot™ 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot Kit” foram adquiridos através da Invitrogen Molecular Probes (Eugene, USA). A membrana de PVDF foi adquirida através da Millipore (USA).

1.4. Soluções

Tabela II.1 – Tampão hipotônico utilizado para a extração de proteínas citoplasmáticas (acertar pH para 7,9).

Reagente	Concentração
HEPES/KOH	10 mM
MgCl ₂	2 mM
EDTA	0,1 mM
KCl	10 mM
DTT*	1 mM
NonidetP-40*	1% (v/v)
“Cocktail” Inibidores de Proteases*	1% (v/v)
“Cocktail” Inibidores de Fosfatases*	1% (v/v)
H ₂ O	1 mL ♦

*Adicionados ao tampão imediatamente antes da utilização; ♦Volume final

Tabela II.2 – Tampão salino utilizado para a extração de proteínas nucleares (acertar pH para 7,9).

Reagente	Concentração
HEPES/KOH	50 mM
KCl	50 mM
NaCl	300 mM
EDTA	0,1 mM
Glicerol (50%)*	10% (v/v)
DTT*	1 mM
PMSF*	0,5 mM
“Cocktail” Inibidores de Proteases*	1% (v/v)
“Cocktail” Inibidores de Fosfatases*	1% (v/v)
H ₂ O	1 mL ♦

*Adicionados ao tampão imediatamente antes da utilização; ♦Volume final

Tabela II.3 – “Laemmli Buffer” 2x utilizado para desnaturar e carregar as amostras no gel de electroforese (acertar pH para 6,8 e armazenar a -20°C).

Reagente	Concentração
SDS	4% (p/v)
Glicerol	20% (p/v)
Azul de Bromofenol	0,005%
Tris HCl (1M)	125 mM
β-Mercaptoetanol*	10% (v/v)
H ₂ O	4 mL ♦

*Adicionados ao tampão imediatamente antes da utilização; ♦Volume final

Tabela II.4 – Tampão de Electroforese 10x utilizado para electroforese SDS-PAGE (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C).

Reagente	Concentração
SDS	1% (p/v)
Trizma Base	250 mM
Glicina	1,92 M
H ₂ O	1000 mL♦

♦Volume final

Tabela II.5 – Tampão de Transferência 10x utilizado para transferir as proteínas do gel para a membrana PVDF (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C).

Reagente	Concentração
Trizma Base	250 mM
Glicina	1,92 M
Metanol*	20% (v/v)
H ₂ O	1000 mL♦

*Adicionados ao tampão imediatamente antes da utilização; ♦Volume final

Tabela II.6 – Composição do Tampão TBE 10x utilizado para manter o DNA desprotonado e solúvel em água (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C).

Reagente	Concentração
Trizma Base	892 mM
Ácido Bórico	890 mM
EDTA 0,5M	20 mM
H ₂ O	1000 mL♦

♦Volume final

Tabela II.7 – “Loading Buffer” (10mL) utilizado para manter o DNA desprotonado e solúvel em (acertar pH para 8,3 e armazenar a 4°C).

Reagente	Concentração
Azul de Bromofenol	37,5 mM
TBE 10x	5 mL
Glicerol	40 mM
H ₂ O	109 mM

Tabela II.8 – Verseno 10x utilizado como reagente não-enzimático para a dissociação celular (armazenar a 4°C).

Reagente	Concentração
NaCl	1,37 M
KCl	54 mM
EDTA	5,5 mM
Vermelho de Fenol	0,55 mM
H ₂ O	1000 mL ♦

♦Volume final

1.5. Linhas Celulares

1.5.1. MDA-MB-231

A linha celular MDA-MB-231 foi estabelecida em 1973 no Instituto Oncológico M. D. Anderson, a partir de uma efusão pleural de uma paciente do sexo feminino com carcinoma mamário. *In vitro*, estas células apresentam um fenótipo invasivo encontrando-se descritas como sendo negativas para os receptores de estrogénio (ER). Esta linha celular é considerada metastática.

As células MDA-MB-231 de cancro de mama possuem uma morfologia tipo epitélio e têm forma de fuso (Figura II.1A). Em cultura, estas células crescem de forma aderente em mono camada e o tempo de duplicação varia entre 25 a 30 horas.

A linha celular utilizada no decorrer deste trabalho foi gentilmente cedida pelo investigador e Professor Doutor Nuno Oliveira da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

1.5.2. MCF7

A linha celular MCF7 foi inicialmente isolada em 1970 a partir de uma efusão pleural de uma paciente de 69 anos do sexo feminino com carcinoma mamário metastático, na “Michigan Cancer Foundation – 7”. *In vitro*, esta linha celular detém a capacidade de processar estrogénio, na forma de estradiol, através de receptores de estrogénio localizados no citoplasma da célula e são sensíveis à citoqueratina.

As células de cancro de mama MCF7 têm a capacidade de formar aglomerados, possuem uma morfologia tipo epitélio e crescem de forma aderente em mono camada (Figure II.1B). O tempo de duplicação destas células é de, aproximadamente, 50 horas.

A linha celular utilizada no decorrer deste trabalho foi adquirida através da ATCC .

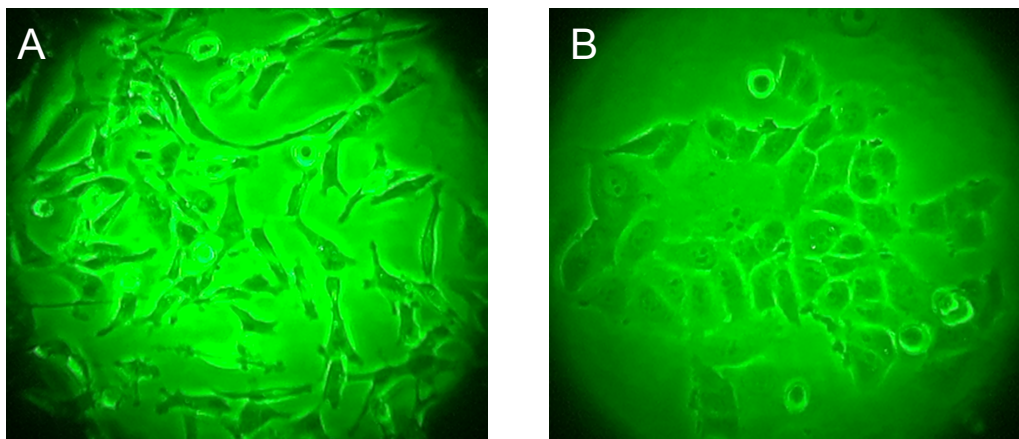


Figura II.1 – A) Células de cancro de mama MDA-MB-231 em cultura; **B)** Células de cancro de mama MCF7 em cultura; ambas fotografias foram captadas com um microscópio de inversão de fases (TMS, Nixon) com uma ampliação de 200x.

2. Métodos

2.1. Cultura celular

As células MDA-MB-231 e MCF7 foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm² (Starsted) e meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (DMEM), contendo 10% de soro bovino fetal (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂. Para a cultura das células MCF7 adicionou-se 1% de insulina.

2.1.1. Subcultura de células aderentes

As células foram mantidas em cultura até atingirem cerca de 70% de confluência (cerca de 3 dias) e após esse período as células foram tripsinizadas conforme o protocolo a seguir descrito. O meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas utilizando uma solução de verseno (2 mL por 10 cm² de área de superfície de cultura) para remover resíduos de células mortas, meio de cultura e soro ainda presentes no frasco. De seguida, adicionou-se ao frasco de cultura uma solução de tripsina-verseno (0,5 mL tripsina por 10 cm² de área de superfície de cultura; a um rácio de 1:9) para quebrar as interações célula-substrato e célula-célula. Esta solução deve cobrir totalmente toda a camada celular. O frasco de cultura foi incubado à temperatura ambiente até cerca de 90% das células estarem soltas. Seguidamente, adicionou-se 2 volumes de meio de cultura à camada celular para inativar a tripsina. As células foram transferidas para um tubo de centrifuga e centrifugou-se (Centric 322A, Tehtnica) a 1000xg durante 5 min. Após isto, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura e voltou-se a incubar cerca de 1:5 de células por passagem. No final do procedimento, o frasco de cultura foi de novo colocado numa incubadora a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂.

2.2. Tratamento com químico/Exposição prolongada

As soluções “stock” de α -Asarone (100 mM), β -Asarone (100 mM), curcumina (10 mM), elemicina (10 mM), eugenol (100 mM), genisteína (100 mM), miristicina (100 mM) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO).

Inicialmente, pré-incubou-se as células de cancro de mama MDA-MB-231 e MCF7 em meio completo DMEM a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente, adicionou-se os fitoquímicos em estudo ao meio, numa concentração final de 10 μ M (não excedendo 0,1% de DMSO no final), e as células foram incubadas durante 360 h (15 dias), realizando-se a subcultura, com nova adição de 10 μ M fitoquímico, e a extração de células a cada três dias, ou seja, às 72 h (3 dias), 144 h (6 dias), 216 h (9 dias), 288 h (12 dias) e 360 h (15 dias). O mesmo procedimento foi realizado para as células controlo, onde se adicionou apenas DMSO (0,1%). Como controlo positivo utilizou-se o DAC, agente com conhecida atividade desmetilante. As células foram incubadas com 2,5 μ M deste químico e a extração foi realizada aos 5 dias de exposição; aos 3 dias de incubação mudou-se o meio e adicionou-se novamente 2,5 μ M de DAC.

2.3. Ensaio de viabilidade celular (método de exclusão por azul de tripano)

Em cada 3 dias e após a centrifugação das células durante 5min a 1200xg e 4°C (Megafuge 10R, Heraeus Instruments), ressuspendeu-se as células em 1 mL de meio. De seguida, preparou-se uma diluição com 2 μ L (1%) de solução *stock* de azul de tripano, 14 μ L de solução salina de tampão de fosfatos (PBS) e 4 μ L de células (rácio de 1:5). Realizou-se a contagem das células com o auxílio de um hemocítmetro manual (câmara de Neubauer), no microscópio óptico (Dialux 20-Leitz) com uma ampliação de 500 vezes.

Este método baseia-se no princípio que o azul de tripano apenas atravessa a membrana celular e entra no citoplasma quando a permeabilidade desta aumenta, o que está relacionado com a perda de viabilidade. Posto isto, células coradas de azul são consideradas células não viáveis e células não coradas são consideradas células viáveis. A viabilidade celular é então calculada dividindo o número de células viáveis pelo número total de células contadas.

O número total de células contadas é multiplicado pelo factor de diluição e, sabendo que o volume da câmara de Neubauer é de $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$, calculou-se o número de células presentes numa suspensão de 1 mL.

2.4. Extração de proteínas citoplasmáticas/nucleares

Após tripsinização, como descrito no subcapítulo 2.1.1., as células foram centrifugadas durante 5min a 250xg e 4°C (Megafuge 10R, Heraeus Instruments). Seguidamente, lavou-se o *pellet* de células duas vezes com PBS gelado e após a segunda lavagem todo o sobrenadante foi removido e descartado, deixando o *pellet* o mais seco possível.

Foi, então, adicionado o tampão hipotónico gelado ao *pellet* de células, numa proporção de 400 μ L por 1×10^7 células, ressuspendeu-se e a amostra foi incubada em gelo durante 5 min. De seguida,

centrifugou-se a amostra durante 5min a 4000xg e 4°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf) e o sobrenadante, contendo os extratos citoplasmáticos, foi armazenado a -80°C.

Ressuspendeu-se o *pellet* em tampão salino, numa proporção de 100 µL por 1×10^7 células, e a amostra foi levada ao vórtex durante 15 seg e incubada em gelo durante 20 min, com vórtex contínuo. Após a incubação, a amostra foi de novo levada ao vórtex (30 seg) e centrifugou-se durante 5 min a 15000xg e 4°C (Centrifuge 5417R, Eppendorf). O sobrenadante contendo os extratos nucleares foi armazenado a -80°C.

2.4.1. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas realizou-se através do método de “Bradford” (“Bio-Rad Protein Assay”). O método foi realizado segundo as instruções do fornecedor. Utilizou-se como referência uma curva padrão preparada a partir de uma solução “stock” de albumina sérica de bovino (BSA) (2 mg/ml). As leituras foram realizadas no espectrofotómetro (Zenyth 3100, com o “Software for Anthos Multimode Detectors” v.2.1.0.17), em triplicado, utilizando um filtro de 595 nm.

2.5. Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se o “AllPrep DNA/RNA Mini Kit”; a extração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante no capítulo que diz respeito a células animais. As células foram colhidas do frasco de cultura através do método da tripsina, seguindo o procedimento descrito anteriormente (subcapítulo 2.1.1.).

2.5.1. Quantificação de DNA

O DNA foi quantificado por espectrofotometria no Nanodrop ND 1000 com o software Nanodrop 1000 v3.7.1. Foram realizadas leituras de absorvância a 260 nm e 280 nm e a concentração (ng/µL) e pureza de cada amostra foram calculadas e geradas automaticamente pelo software.

2.6. Western Blot

As proteínas foram desnaturadas com a adição de “Laemmli Buffer” 2x e com aquecimento a 95°C durante 5 min. Seguidamente, as amostras contendo 40 µg de proteína foram separadas por electroforese utilizando géis de acrilamida (“Mini-PROTEAN® TGX™ Precast”) com gradiente de concentração de 4-15% ou 4-20%, dependendo da proteína de interesse. Para a eletroforese utilizou-se tampão de electroforese a 1x e esta foi realizada a 100 volts durante 1 h e 30 min.

Após a separação das proteínas por eletroforese, realizou-se a transferência das proteínas do gel de acrilamida para a membrana “Polyvinylidene difluoride” (PVDF). Efetuou-se a transferência com tampão de transferência 1x a 100 volts durante 1 h.

Seguidamente, realizou-se a imunodeteção onde se utilizou o kit “WesternDot™ 625 Goat Anti-Mouse Western Blot” (se o anticorpo primário a detectar era de rato) ou o kit “WesternDot™ 625 Goat Anti-Rabbit Western Blot” (se o anticorpo primário a detectar era de coelho). Todos os reagentes utilizados na imunodeteção estão incluídos no kit, com exceção dos anticorpos primários. Incubou-se a membrana PVDF com o agente bloqueador (ao qual se adicionou, previamente, 5% de

leite magro em pó e 0,05% de “tween” 20) durante 1 h. Descartou-se o agente bloqueador e adicionou-se à membrana o anticorpo primário (Tabela II.10) e incubou-se a 4°C durante a noite (no máximo 16 h). Lavou-se a membrana 5 vezes com tampão de lavagem e, seguidamente, incubou-se com anticorpo secundário acoplado a biotina (diluição de 1:1000) durante 1 h. Lavou-se 3 vezes e incubou-se com estreptavidina (diluição de 1:2000), acoplada com um “Q-Dot” que emite fluorescência quando exposto a luz UV, durante 1 h. Realizou-se as últimas 3 lavagens e expôs-se a membrana à luz UV no transiluminador Fluo Link da Vilber Lourmat. As imagens foram captadas com uma máquina fotográfica (Fujifilm 55000), utilizando um filtro UV Jessop de 55 mm. Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas à temperatura ambiente com agitação orbital (com exceção do anticorpo primário, incubado a 4°C durante a noite); todas as lavagens foram realizadas à temperatura ambiente com agitação orbital, durante 5 min.

Tabela II.9 – Lista de anticorpos primários utilizados na técnica Western Blot.

Anticorpo primário	Peso molecular proteína (kDa)	Diluição	Origem	Fornecedor
ATM	~370	1:1000	Coelho Monoclonal	Millipore
Bax	-23	1:500	Ratinho Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Bcl-xl	-30	1:500	Ratinho Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
H2AX	~17	1:1000	Ratinho Monoclonal	Millipore
Lamina B1	~68	1:200	Ratinho Monoclonal	Genetex
β-Actin	~43	1:1000	Ratinho Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology

2.7. PCR específico para a metilação (MSP)

2.7.1. Transformação bissulfito

A transformação bissulfito baseia-se na desaminação de citosinas não metiladas, produzindo uracilos na cadeia simples de DNA (Figura II.2), que irão ser lidos como timinas durante a reação de amplificação. Por outro lado, as citosinas metiladas reagem insuficientemente com o bissulfito de sódio e são mais lentamente deaminadas, mantendo-se citosinas (5-mC), que serão lidas como citosinas durante a PCR (Huang *et al.*, 2010; Herman *et al.*, 1996).

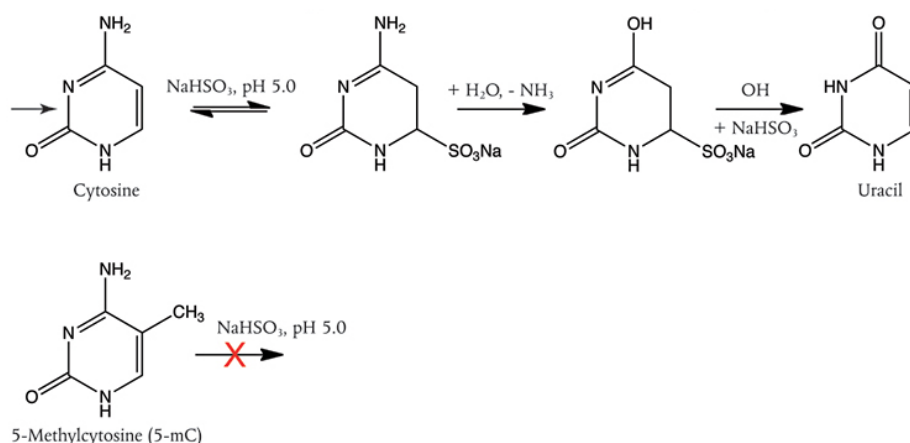


Figura II.2 – Etapas da transformação bissulfito de uma citosina não metilada e de uma citosina metilada (adaptado de Huang *et al.*, 2010).

A transformação foi realizada com o kit “EZ DNA Methylation-Gold™”, segundo as instruções do fornecedor. Na realização desta técnica utilizaram-se amostras de DNA genómico, extraído como descrito anteriormente (subcapítulo 3.5), e como controlo utilizou-se DNA completamente metilado e DNA completamente não metilado (para confirmar a eficiência da transformação). A quantidade de DNA genómico utilizado para a transformação foi de 300 ng por reação e, no final, o DNA transformado foi armazenada a -20°C.

2.7.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR específica para a metilação baseia-se no facto de que dois pares de primers diferentes são desenhados para a mesma sequência, com o intuito de diferenciar o DNA modificado pela transformação bissulfito (par Não Metilado) do DNA que não sofreu modificação (par Metilado) (Figura III.3) (Li e Dahiya, 2002). Uma vez que após a transformação bissulfito apenas permaneceram na sequência de DNA as citosinas metiladas, pois as citosinas não metiladas foram transformadas em uracilos, as sequências escolhidas para os primers são complementares de regiões que contêm um elevado número de citosinas para maximizar a eficiência da técnica (Sasaki *et al.*, 2003). No final da PCR, produto de amplificação na reação em que se utilizou o par de primers metilado indica que a região está metilada; ao passo que, produto de amplificação na reação em que se utilizou o par de primers não metilado indica que a região está não metilada (Li e Dahiya, 2002; Zhang *et al.*, 2009).

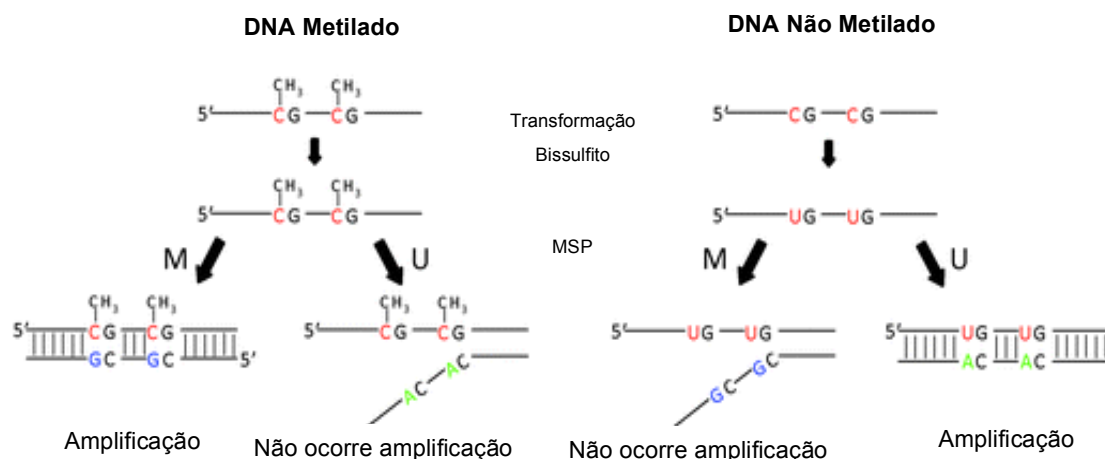


Figura II.3 – Etapas e resultado de uma MPS (adaptado de Zhang *et al.*, 2009).

As ilhas CpG presentes nas regiões promotoras nos genes *DAPK1*, *GSTP1* e *RASSF1A* e do miR124-3 foram identificadas recorrendo à bases de dados informática “UCSC Genome Bioinformatics Site”. Seguidamente, desenhou-se os pares de primers para a PCR recorrendo ao programa “Methyl Primer Express[®] software v1.0” (Applied Biosystems, Foster City, CA) e comparou-se com os pares de primers descritos na literatura. As sequências dos primers utilizados e as respectivas temperaturas de hibridação encontram-se na Tabela II.10.

A PCR realizou-se de acordo com as instruções do fabricante, recorrendo-se ao termociclador GeneAmp PCR Ssystem 9700 (Applied Biosystems); as condições de reação utilizadas para a amplificação do DNA estão descritas na Tabela II.11. Todas as PCRs foram realizadas com controlo para o alelo metilado, controlo para o alelo não metilado e controlo sem DNA para verificar contaminações (dados não apresentados). Após a PCR, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 4%, com brometo de etídio incorporado. Em cada poço do gel foi carregado loading buffer e amostra numa proporção 1:5. Depois de realizada a eletroforese, o gel foi exposto à luz UV no transiluminador Fluo Link da Vilber Lourmat e as imagens foram captadas com uma máquina fotográfica (Fujifilm 55000), utilizando um filtro UV Jessop de 55 mm.

Tabela II.10 – Sequência dos primers utilizados para a MPS e respetiva temperatura de hibridação utilizada na PCR. M – par de primers específicos para a sequência metilada; NM – par de primers específicos para a sequência não metilada.

Gene		Sequência primer (5'-3')		Temperatura hibridação (°C)
DAPK1	M	Forward	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	57
		Reverse	CCCTCCCAAACGCCGA	
	NM	Forward	GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	57
		Reverse	CAAATCCCTCCCAAACACCAA	
GSTP1	M	Forward	TTCGGGGTGTAGCGCTCGTC	60
		Reverse	GCCCAATACTAAATCACGACG	
	NM	Forward	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	60
		Reverse	CCACCCAATACTAAATCACAACA	
RASSF1A	M	Forward	GTTGGTATTCGTTGGGCGC	56
		Reverse	GCACCACGTATACGTAACG	
	NM	Forward	GGTTGTATTGGTTGGAGTG	56
		Reverse	CTACAAACCTTTACACACAACA	
miR124-3	M	Forward	CGGGATTGGTAATTACGTTC	56
		Reverse	CGAAAAACGCTCGAACTAT	
	NM	Forward	GTTGGGATTGGTAATTATGTTT	56
		Reverse	CAAAAAACACTCAAACCTATTC	

Tabela II.11 – Condições utilizadas no termociclador para a realização da PCR.

Etapa	Numero de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Desnaturação inicial	1	95	10 min
Desnaturação	40	94	30 seg
Hibridação		*	30 seg
Extensão		72	30 seg
Extensão final	1	72	7 min
		4	∞

*a temperatura de hibridação dos primers varia dependendo da sua sequência.

CAPÍTULO III – RESULTADOS

A fase inicial deste trabalho consistiu na exposição das células de cancro da mama MDA-MB-231 e MCF7 aos fitoquímicos α -asarone, β -asarone, curcumina, elemicina, eugenol, genisteína e miristicina, a uma concentração de 10 μ M, durante 15 dias. Durante o tratamento das células, foram obtidos extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares, DNA e RNA a cada três dias (3, 6, 9, 12 e 15 dias) (Anexos – Secção I). No entanto, em tempo útil, apenas foi possível realizar o estudo na linha celular MCF7 com tratamento com a elemicina, o eugenol e a genisteína.

1. Fitoquímicos e viabilidade celular

Avaliou-se a citotoxicidade da elemicina, do eugenol e da genisteína em células MCF7, com recurso ao método de exclusão por azul de tripano. A viabilidade celular foi estimada a cada 3 dias de exposição a 10 μ M de fitoquímico; ou seja, aos 3, 6, 9, 12 e 15 dias de exposição.

Como se pode observar na Figura III.1, aos 3 dias de incubação todos os fitoquímicos em estudo induzem uma diminuição na viabilidade celular de cerca de 10%. Aos 6 dias de incubação com a elemicina observa-se um aumento na viabilidade celular, para cerca de 97%. Nos dias de incubação seguintes (9, 12 e 15) observou-se uma diminuição mais gradual da viabilidade, sendo que aos 15 dias de exposição a viabilidade celular era de cerca de 83%. No que diz respeito ao eugenol, a viabilidade celular diminuiu gradualmente até atingir os 75% aos 9 dias de exposição. Aos 12 dias de incubação a viabilidade aumenta cerca de 5%, voltando a diminuir aos 15 dias, atingindo 74%. Em relação à genisteína a viabilidade celular diminui de forma gradual ao longo do tempo de exposição, observando-se a diminuição mais acentuada, de cerca de 15%, entre os 9 e os 12 dias de exposição. Aos 15 dias de incubação a viabilidade celular atingiu os 68%.

Ao longo dos 15 dias de exposição os compostos em estudo, nesta concentração, foram pouco citotóxicos, nunca atingindo 50% de morte celular.

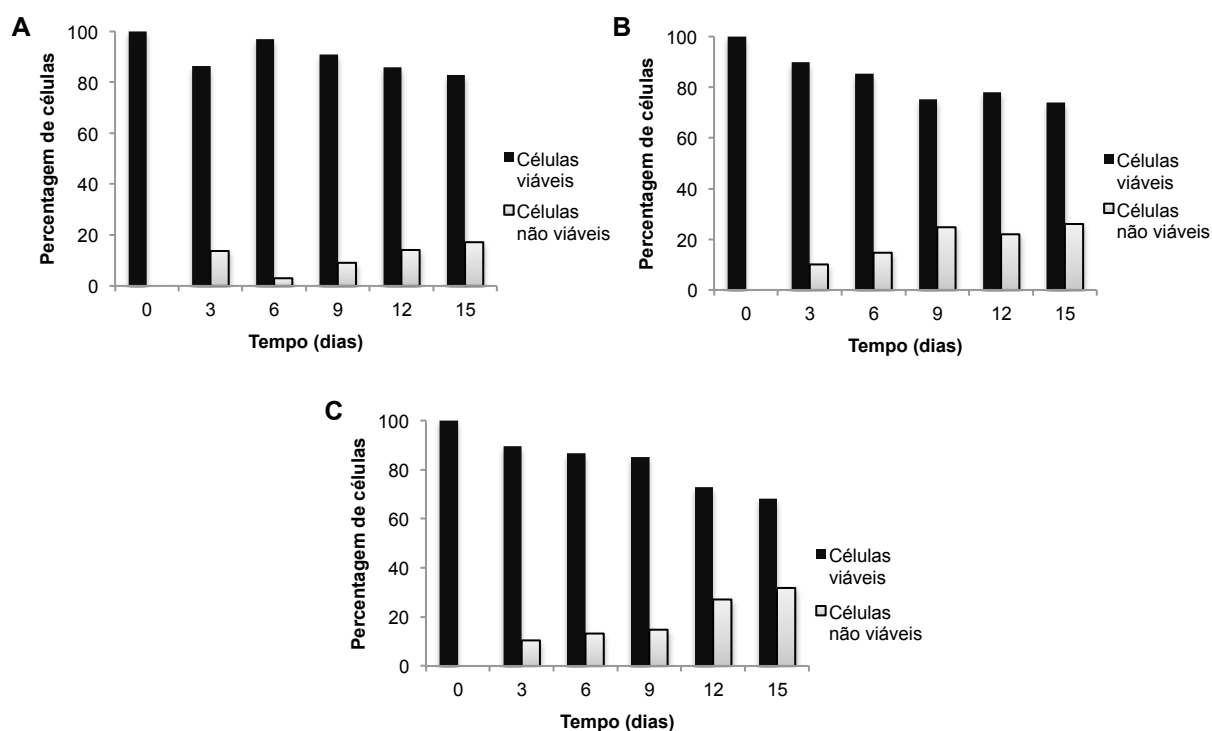


Figura III.1 – Variação da viabilidade celular das células MCF7 após incubação com os fitoquímicos **A)** elemicina, **B)** eugenol e **C)** genisteína.

2. Indicadores de genotoxicidade

Seguidamente e com o intuito de perceber se a exposição aos fitoquímicos em estudo induziria genotoxicidade nas células MCF7, recorreu-se à técnica de Western Blot para avaliar se existiam alterações na expressão de proteínas envolvidas no mecanismo de resposta a lesões no DNA, nomeadamente reparação e apoptose. A expressão destas proteínas foi determinada por análise dos extratos nucleares ou citoplasmáticos consoante a localização celular da proteína em estudo, após exposição a 10 μ M de eugenol, elemicina e genisteína durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias. Utilizou-se os extratos nucleares para avaliar a expressão da proteína ATM e da fosforilação da proteína H2AX e como controlo interno destes extratos utilizou-se a Lamina B1; para as proteínas Bax e Bcl-xl utilizou-se os extratos citoplasmáticos e como controlo interno utilizou-se a β -Actina. Como controlo positivo foi utilizado o DAC, uma vez que vários estudos já demonstraram a sua cito e genotoxicidade e a sua atividade desmetilante; as células foram incubadas com 2,5 μ M DAC durante 5 dias.

Como se pode observar na Figura III.2A, nas células controlo (tratadas com DMSO) a proteína ATM é expressa. Comparando com a expressão do ATM, após a exposição das células MCF7 aos compostos, observa-se uma ligeira diminuição da expressão da proteína aos 6 dias de incubação com a elemicina, no entanto aos 15 dias existe um aumento da expressão (cerca de 0.5 vezes). A incubação das células com o eugenol levou a um ligeiro aumento na expressão da proteína aos 6 dias. Por outro lado, a incubação com a genisteína não teve um efeito significativo na expressão do ATM (Figura III.2A e 2B).

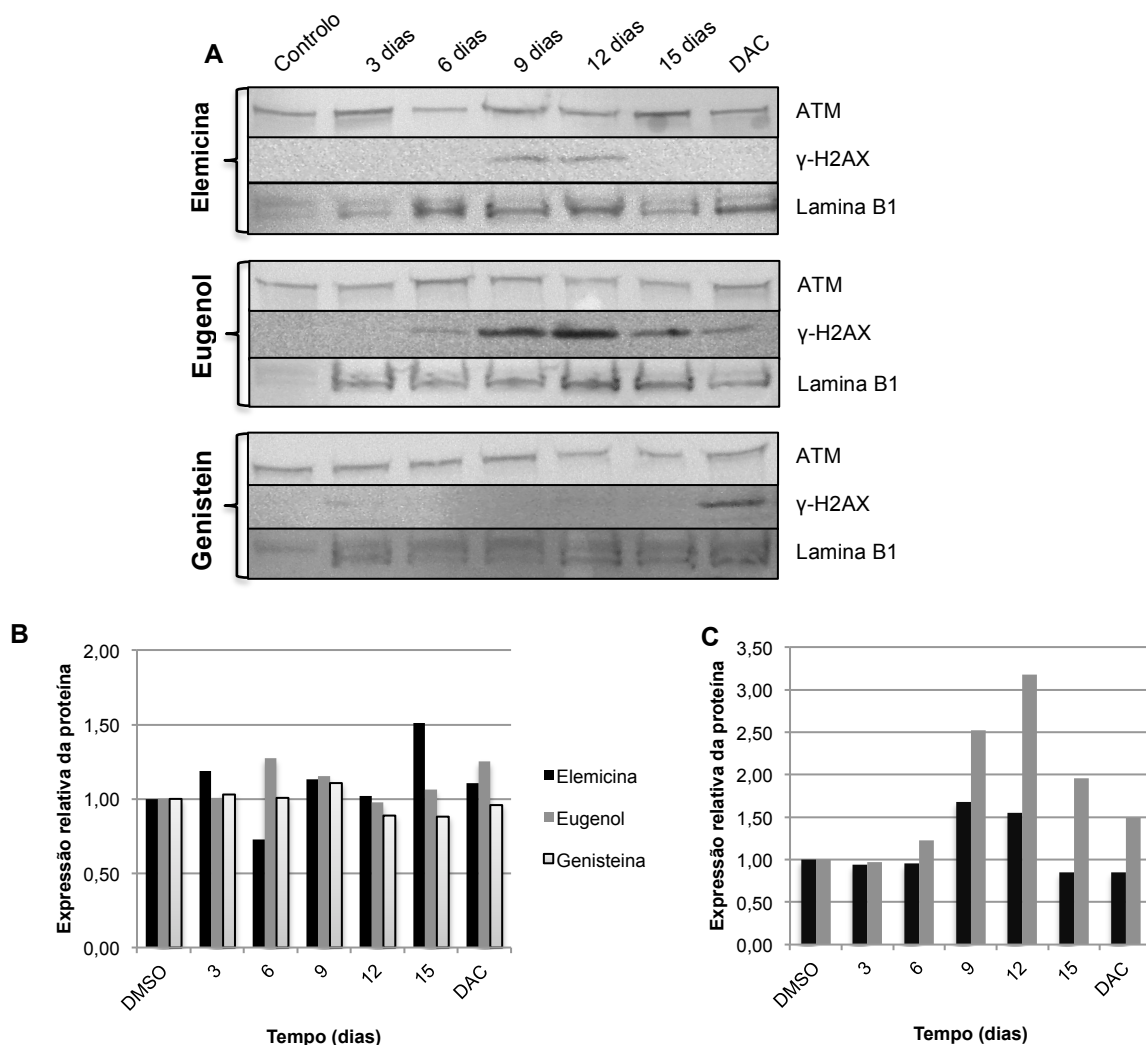


Figura III.2 – A) Expressão das proteínas ATM e γ-H2AX; a Lamina B1 foi utilizada como controlo interno; **B)** Expressão relativa da proteína ATM e **C)** da proteína γ-H2AX calculada em função das células controlo, tratadas com DMSO (expressão igualada a 1).

No que diz respeito à histona H2AX, é possível observar (Figura III.2A) que esta não está fosforilada nas células controlo, no entanto há uma ligeira fosforilação da proteína aos 9 e 12 dias de incubação com a elemicina (Figura III.2A e 2C). A exposição ao eugenol levou, por outro lado, a um aumento marcado da fosforilação da histona, sendo este aumento de cerca de 1.5 vezes aos 9 dias, 2 vezes aos 12 dias e 1 vez aos 15 dias. Por outro lado, não se observaram alterações consideráveis na fosforilação do H2AX nas células expostas à genisteína.

Em relação à proteína Bax, é possível observar que é expressa nas células controlo e que existe uma ligeira diminuição da sua expressão aos 9, 12 e 15 dias de incubação com a elemicina (Figura III.3A e 3B). Por outro lado, observa-se um ligeiro aumento da expressão da proteína Bax aos 9 e 12 dias de exposição à genisteína. A proteína Bcl-xl não é expressa nas células controlo e a sua expressão também não apresenta variações durante os 15 dias de incubação com os fitoquímicos (Figura III.3A e 3C).

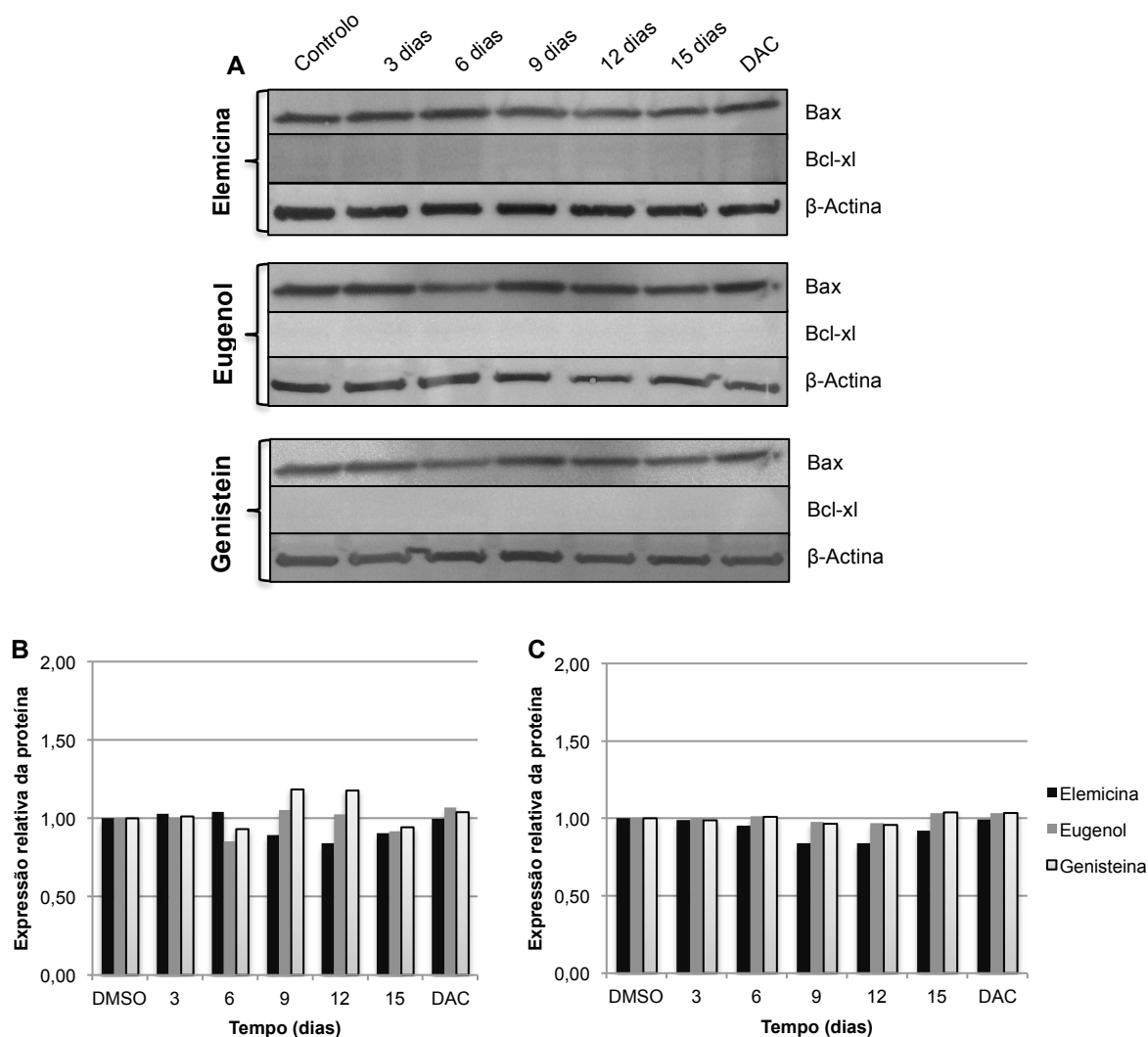


Figura III.3 – A) Expressão das proteínas Bax e Bcl-xl; β -Actina foi utilizada como controlo interno; **B)** Expressão relativa da proteína Bax e **C)** da proteína Bcl-xl calculada em função das células controlo, tratadas com DMSO (expressão igualada a 1).

3. Alteração do padrão de metilação

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos fitoquímicos em alterar o padrão de metilação de genes envolvidos na apoptose (*DAPK1*) e destoxificação (*GSTP1*), gene supressor de tumor (*RASSF1*) e microRNA supressores de tumor (*miR124-3*), realizou-se a técnica de transformação de bissulfito do DNA seguida de MSP. O padrão de metilação destes genes foi analisado em amostras de DNA genómico das células que foram, previamente, incubadas com 10 μ M de eugenol, elemeicina e genisteina durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias. O DAC foi utilizado neste ensaio como controlo positivo, uma vez que vários estudos já demonstraram a sua atividade inibitória das DNMTs e, consequentemente, a sua ação desmetilante; as células foram incubadas com 2,5 μ M DAC durante 5 dias. O DMSO foi utilizado como controlo negativo; foram realizados MSP para observar a metilação das regiões promotoras de todos os genes em estudo ao longo da exposição de 15 ao controlo negativo (dados não apresentados). Uma vez que a metilação das regiões promotoras dos genes

não sofreu alterações com a exposição ao DMSO, o controle utilizado nos MSP apresentados é o das células expostas 3 dias ao DMSO.

No que diz respeito ao *DAPK1*, nenhum fitoquímico alterou consideravelmente o padrão de metilação da região promotora do gene (Figura III.4).

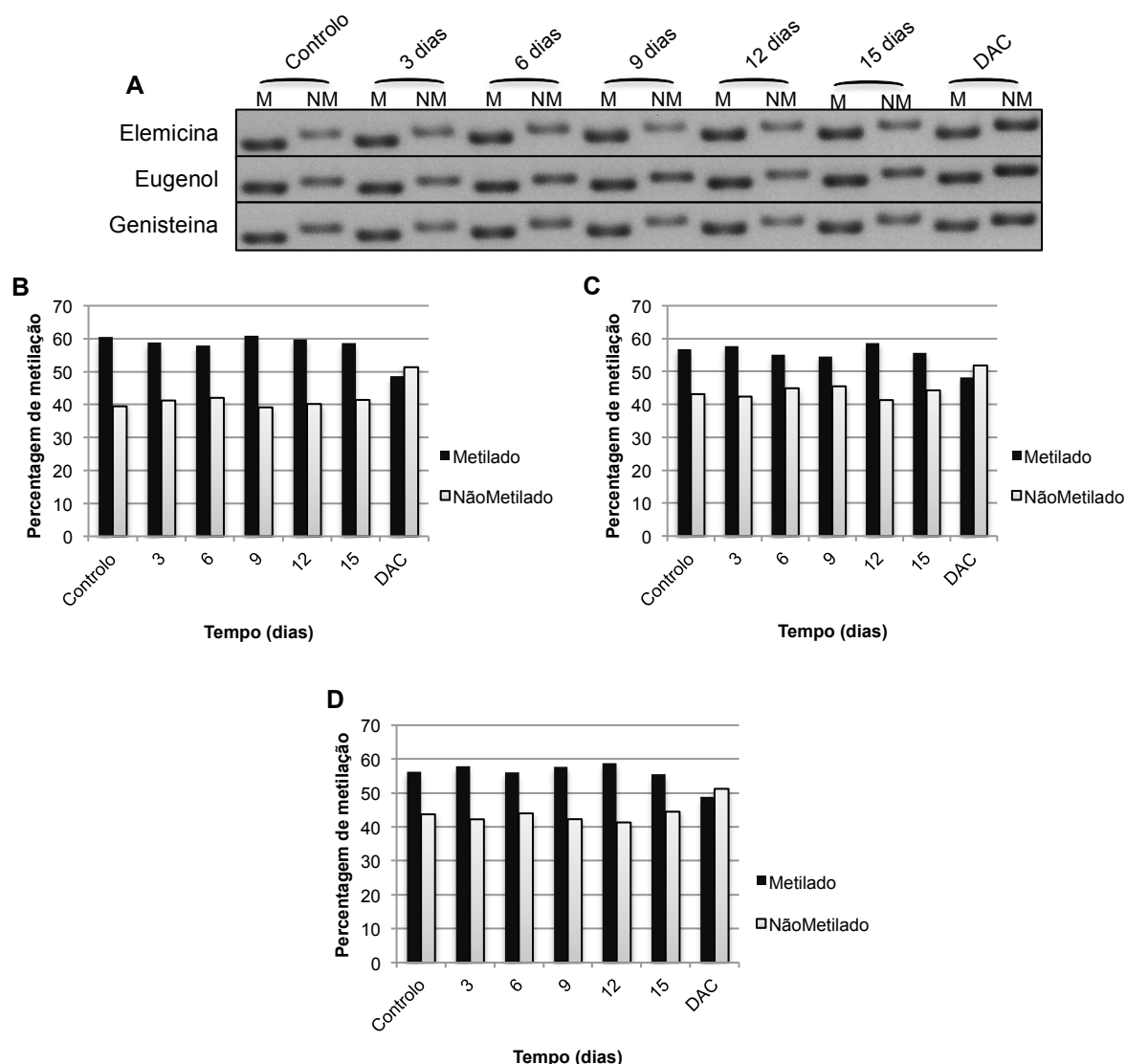


Figura III.4 – A) Padrão de metilação do gene *DAPK1* após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteina; **B)** percentagem de metilação do gene *DAPK1* após exposição das células MCF7 à elemicina, **C)** eugenol e **D)** genisteina.

Em relação ao *GSTP1*, aos 3 dias de incubação com a elemicina parece haver uma metilação completa da região promotora do gene, que volta a estar parcialmente desmetilada nos dias seguintes (Figura III.5A e 5B). O mesmo se observa aos 9 dias de incubação com o eugenol, em que a região promotora do gene fica completamente metilada; no entanto aos 12 e 15 dias de exposição a região volta a estar parcialmente desmetilada (Figura III.5A e 5C). A genisteina não teve efeitos no padrão de metilação (Figura III.5A e 5D).

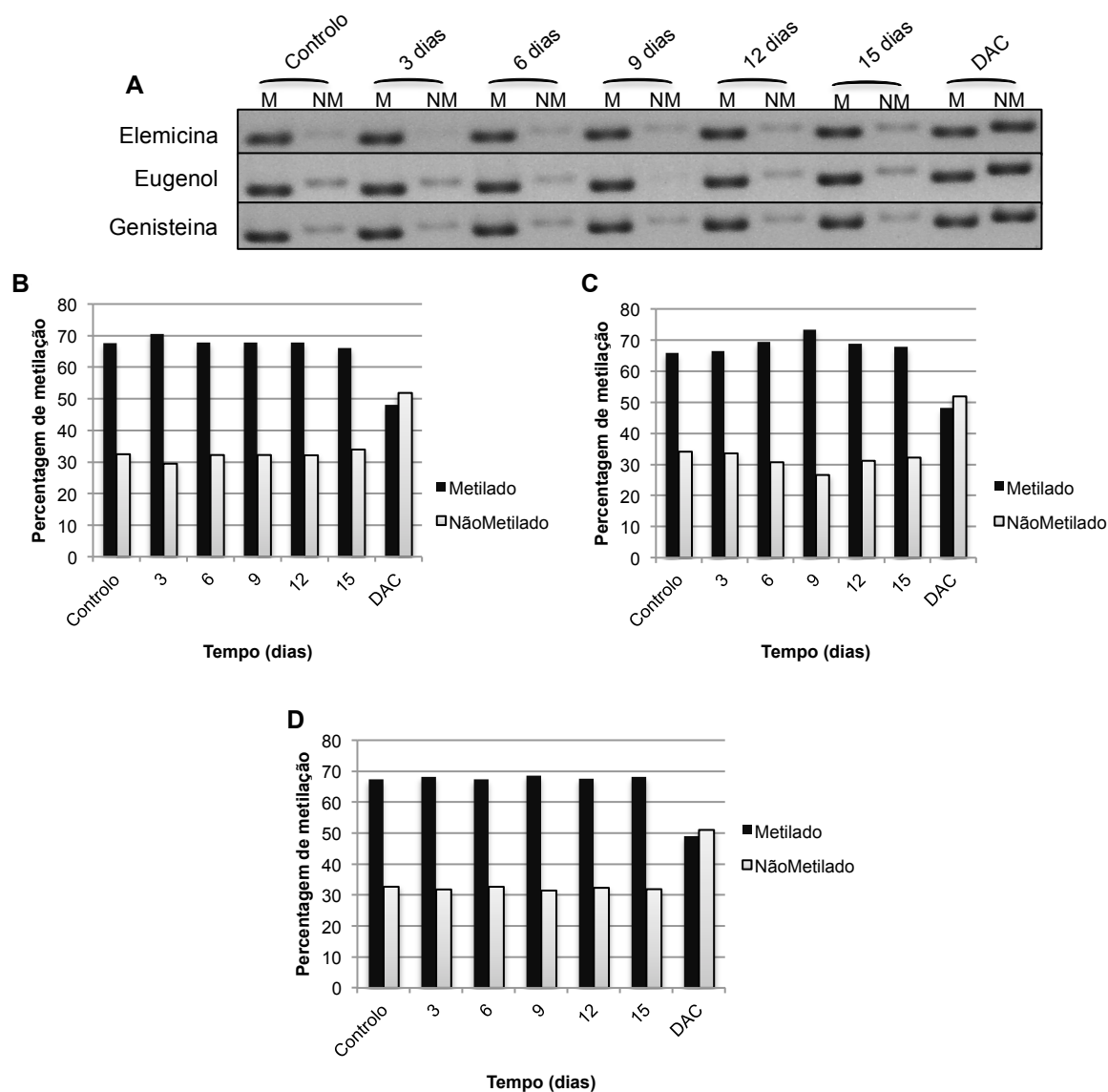


Figura III.5 – A) Padrão de metilação do gene *GSTP1* após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteina; **B)** percentagem de metilação do gene *GSTP1* após exposição das células MCF7 à elemicina, **C)** eugenol e **D)** genisteina.

A exposição das células à elemicina levou a que aos 12 dias de incubação a região promotora do gene *RASSF1A* fosse parcialmente desmetilada, no entanto esta desmetilação não se manteve aos 15 dias de incubação (Figura III.7A e 7B). Aos 3 dias de exposição ao eugenol já é possível observar o efeito desmetilante deste fitoquímico, uma vez há um ligeiro aumento da banda não metilada; o mesmo se observa aos 6 dias de incubação, onde parece existir um aumento da banda correspondente à desmetilação. No entanto, este padrão não se mantém nos dias de incubação posteriores, passando a região a estar completamente metilada novamente (Figura III.7A e 7C). Por outro lado, o tratamento das células com genisteina não mostrou ter efeito no padrão de metilação da região promotora do gene *RASSF1A* (Figura III.7A e 7D).

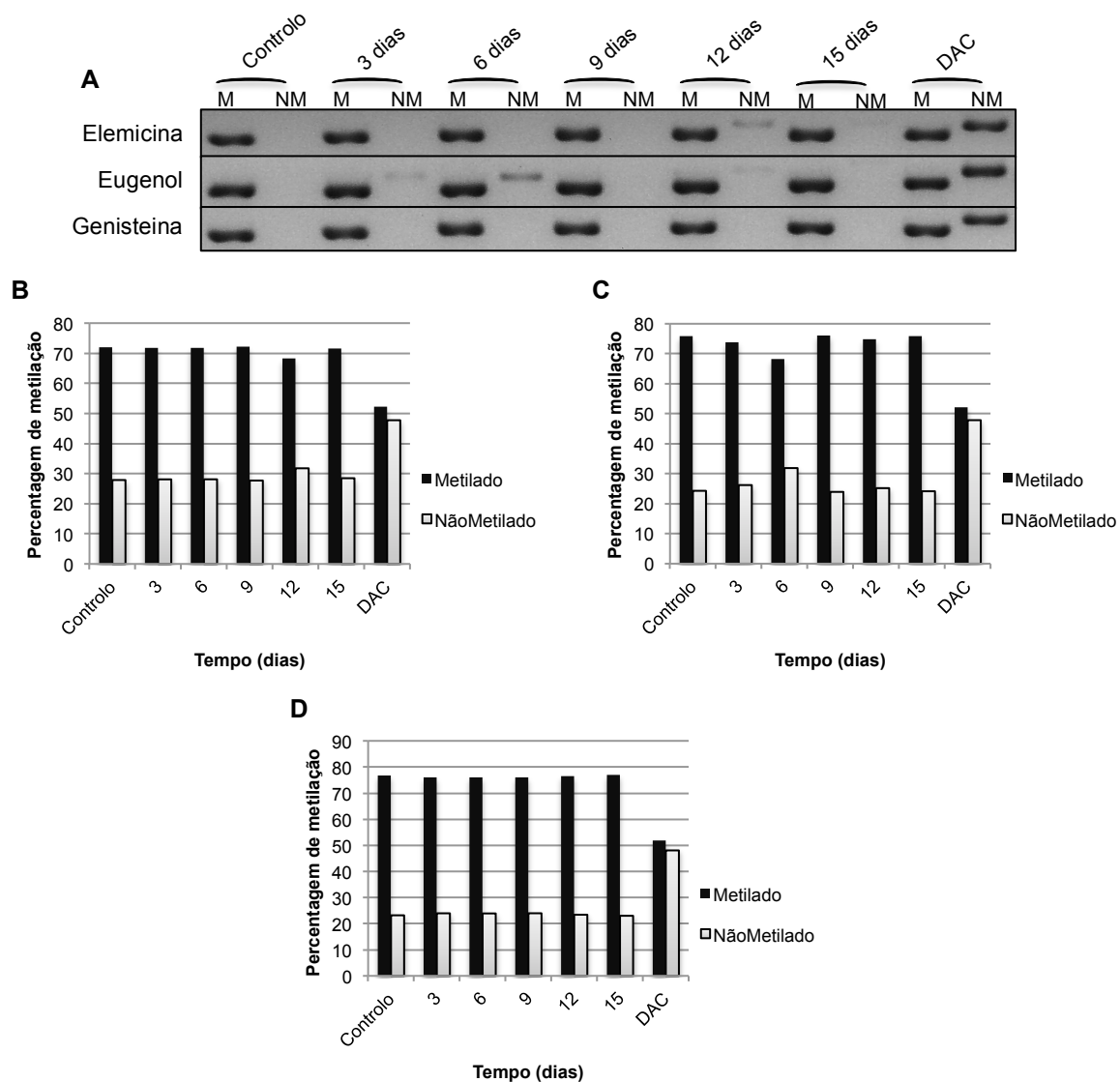


Figura III.6 – A) Padrão de metilação do gene *RASSF1A* após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteína; **B)** percentagem de metilação do gene *RASSF1A* após exposição das células MCF7 à elemicina, **C)** eugenol e **D)** genisteína.

O padrão de metilação da região promotora do *miR124-3* parece não ser afetado pela exposição das células à elemicina (Figura III.6A E 6B). No entanto, este padrão é alterado quando as células são incubadas 15 dias com eugenol, em que a região passa a estar completamente metilada (Figura III.6A E 6C). A genisteína parece alterar a metilação aos 9 e 12 dias, onde existe um ligeiro aumento da metilação da região promotora, no entanto este ligeiro aumento não se mantém aos 15 dias de exposição (Figura III.6A E 6D).

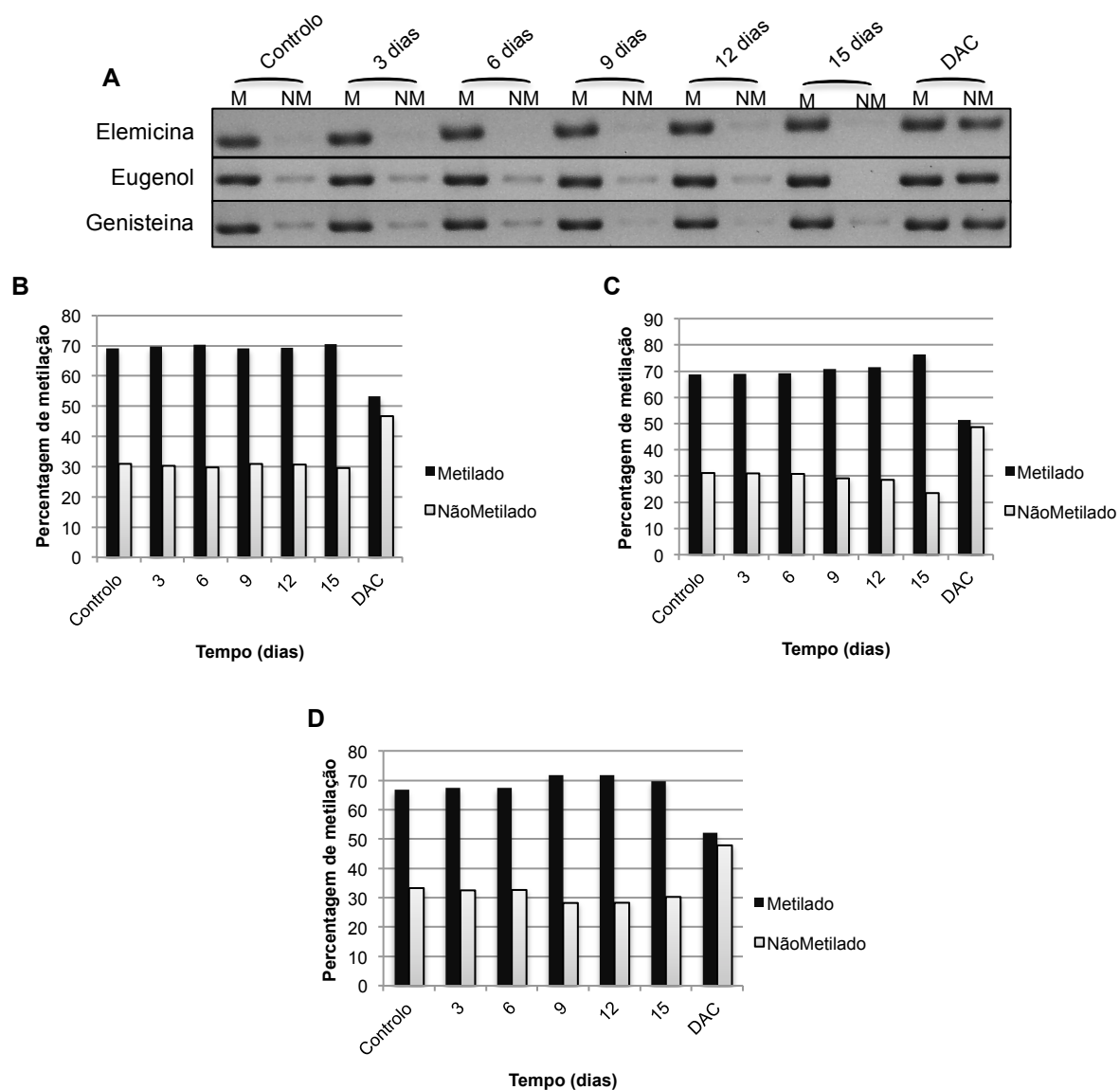


Figura III.7 – A) Padrão de metilação do *miR124-3* após exposição das células MCF7 aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteina; **B)** percentagem de metilação do *miR124-3* após exposição das células MCF7 à elemicina, **C)** eugenol e **D)** genisteina.

CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO

O cancro é uma doença heterogênea que se caracteriza por várias alterações ao nível molecular (Xiang *et al.*, 2008). As alterações genéticas que levam à ativação de oncogenes e à inativação de genes supressores de tumores devem-se essencialmente a mutações nos genes, mas também podem ser adquiridas através de mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA e a modificação das histonas (Hanahan e Weinberg, 2011). Contudo, ao contrário das alterações genéticas as modificações epigenéticas não alteram a sequência do DNA e embora hereditárias podem ser reversíveis (Paluszczak *et al.*, 2010). Os mecanismos epigenéticos são responsáveis pelo estabelecimento da identidade celular e caso ocorram perturbações na determinação do padrão epigenético poderão levar à ativação ou inibição de genes e de vias de sinalização celular, levando ao aparecimento de doenças como o cancro (You e Jones, 2012). Dos vários mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA tem um papel muito importante na regulação da expressão genética e na manutenção da atividade celular, sendo que a hipermetilação de regiões promotoras de determinados genes é uma característica intrínseca do cancro e está implicada na sua iniciação e progressão (Xiang *et al.*, 2008; You e Jones, 2012). Pela característica reversível dos padrões de metilação, têm sido estudados vários compostos enquanto agentes desmetilantes. Inclusive encontram-se em ensaios clínicos para serem utilizados como quimiopreventivos ou como terapêuticos no tratamento do cancro (Xiang *et al.*, 2008). Nas últimas décadas, os estudos realizados sugerem que fitoquímicos presentes em frutas e vegetais têm a capacidade de alterar o padrão de metilação das células, reativando a expressão de genes (Paluszczak *et al.*, 2010).

O principal objetivo deste trabalho foi o de observar, *in vitro*, possíveis alterações epigenéticas após uma exposição prolongada (15 dias) de células de cancro da mama MDA-MB-231 e MCF7 a uma família de compostos naturais chamados alquenilbenzenos. Os alquenilbenzenos estudados foram: α -asarone, β -asarone, elemicina, eugenol e miristicina, a curcumina que é um polifenol e a genisteína que é uma isoflavona; utilizou-se uma concentração de 10 μ M, que é fisiologicamente possível. Os extratos de proteínas e ácidos nucleicos foram obtidos a cada 3 dias de exposição, no entanto, em tempo útil, apenas foi possível realizar o estudo na linha celular MCF7 e com tratamento com a elemicina, o eugenol e a genisteína.

Neste estudo, começou-se por avaliar se a exposição prolongada a concentrações baixas poderia causar alguma citotoxicidade ou genotoxicidade em células de cancro da mama MCF7. De seguida, fomos estudar se existia alteração no padrão de metilação das regiões promotoras de genes importantes para a resposta a lesões no DNA e que se encontram alterados neste tipo de tumores.

Foi possível observar que, ao longo dos 15 dias de incubação, havia uma diminuição gradual da viabilidade celular, sendo esta diminuição dependente do tempo de incubação, mas nunca para níveis abaixo de 65%. A genisteína aparenta ser o fitoquímico mais citotóxico, enquanto que a elemicina demonstra ser a menos citotóxica; contudo, todos os fitoquímicos apresentam uma baixa toxicidade na concentração em estudo, nunca chegando a induzir 50% de morte celular. O facto da genisteína apresentar a citotoxicidade mais elevada, a uma concentração de 10 μ M, corrobora o facto de este fitoquímico ser largamente defendido como quimiopreventivo. Em vários estudos a

genisteína demonstrou inibir a proliferação celular em células de cancro da mama MDA-MB-231, tanto aos 6 dias de exposição a uma concentração de 50 μ M, como às 48 h de exposição a uma concentração de 5-20 μ M (Li *et al.*, 2008; Shon *et al.*, 2006).

No que diz respeito aos ensaios de genotoxicidade, sabe-se, por estudos já realizados, que o eugenol induz lesões no DNA a concentrações de 250 μ M e 750 μ M (Martins *et al.*, 2011), como tal estudou-se a capacidade destes fitoquímicos induzirem lesões no DNA, especificamente DSB, após uma exposição prolongada a uma concentração muito mais baixa, 10 μ M. O ATM responde a DSBs e é o intermediário chave para desencadear a cascata de sinalização que resulta na resposta celular. Após a DSB, a sinalização do ATM envolve uma série de eventos rápidos e coordenados que resultam na ativação de efetores celulares importante (McKinnon, 2004).

Nos resultados obtidos através de Western Blot não foi possível observar nenhuma alteração significativa na expressão desta proteína. No entanto, observou-se que a expressão da proteína está ligeiramente aumentada aos 6 dias de exposição das células ao eugenol. Este aumento pode ser explicado pelo facto do ATM ser uma cinase serina-treonina que sofre fosforilação após ocorrerem lesões no DNA e, consequentemente, inicia uma cascata de sinalização que envolve a fosforilação de diversos substratos, como o H2AX (McKinnon, 2004). Contudo, o anticorpo utilizado neste ensaio deteta a proteína tanto no estado nativo como no estado fosforilado, logo não foi possível observar somente as alterações no estado de fosforilação da proteína.

Para além do ATM e do MRN, outros intermediários chave estão envolvidos na resposta a DSBs, como a histona H2AX, o 53BP1, o MDC1 e o BRCA1; sendo que todos estes factores são substratos do ATM. Após ocorrerem lesões no DNA, estes factores são rapidamente recrutados para o local da DSB e iniciam uma cascata de sinalização dependente do ATM que leva ou à reparação das quebras ou, no caso de existirem excessivas lesões no DNA, à apoptose mediada pelo p53 (McKinnon, 2004). Após DSBs, o ATM rapidamente fosforila o H2AX, formando γ -H2AX (Zha *et al.*, 2008). Após 9 dias de incubação das células com a elemicina começa a haver um ligeiro aumento da fosforilação da proteína H2AX, sendo este aumento de fosforilação mais marcado aos 12 dias de exposição, o que sugere que este fitoquímico induz quebras de cadeia dupla no DNA a exposições prolongadas, mesmo a uma concentração de 10 μ M. No entanto, aos 15 dias de incubação, não foi possível detectar proteína fosforilada. Um explicação plausível para o desaparecimento da histona fosforilada ao fim destes dias, é a ocorrência de uma reparação inicial, com uma consequente resposta adaptativa das células expostas. Por outro lado, não podemos colocar de lado a ocorrência de uma ligeira morte celular ao longo da exposição, com a consequente sobrevivência apenas de células resistentes. No que diz respeito ao eugenol, houve um ligeiro aumento da fosforilação da proteína H2AX aos 6 dias de incubação; uma vez que se observou que a expressão do ATM aumenta ligeiramente aos 6 dias, este resultado demonstra que o ATM parece estar a fosforilar o H2AX. Este aumento da fosforilação é ainda mais marcado nos dias de exposição subsequentes. No tratamento das células com a genisteína não se observou nenhuma diferença significativa na expressão da proteína. Podemos concluir que a elemicina e o eugenol são potencialmente genotóxicos, sendo o eugenol marcadamente indutor de DSB aos 12 dias de incubação, acima do controlo positivo DAC. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Maralhas e seus

colaborados que associaram a genotoxicidade do eugenol à sua capacidade de induzir aberrações cromossómicas em células V79; e por Martins e seus colaboradores que observaram que o eugenol induzia DSB em células CHO, através do ensaio γ -H2AX (Maralhas *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2011). No entanto, nestes estudos, os fitoquímicos foram utilizados em concentrações muito mais elevadas (50 a 3000 μ M) e a exposição aos fitoquímicos nunca excedeu as 24 horas. No caso da elemicina, este fitoquímico demonstrou ser genotóxico no ensaio de síntese não programada de DNA (unscheduled DNA synthesis – UDS), em hepatócitos de ratinho (Hasheminejad e Caldwell, 1994). É de salientar o facto de que o eugenol e a elemicina induziram mecanismos de sinalização que levam à fosforilação da proteína H2AX, mesmo uma concentração de apenas 10 μ M, que é uma concentração relativamente baixa comparada com os estudos referidos.

Em estudos anteriores, foi descrito que a miristicina, um fitoquímico do grupo dos alquenilbenzenos, induz apoptose, através da via da mitocôndria, em células CHO e K562 (Martins *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2014). Tendo em conta estes estudos e o facto que tanto a elemicina como o eugenol induzem DSB, podendo como consequência induzir morte celular, analisou-se a expressão de duas proteínas envolvidas no processo de apoptose dependente da mitocôndria. As lesões no DNA podem levar à ativação e ao transporte de proteínas pro-apoptóticas da família Bcl-2, como a Bax, sendo translocada para a membrana mitocondrial externa, onde permite a sua permeabilização levando à libertação do citocromo c, o que desencadeia a via intrínseca/mitocondrial da apoptose. Aos 9, 12 e 15 dias de exposição à elemicina observa-se uma ligeira diminuição na expressão da proteína Bax, o que leva a supor que esta proteína pode estar a ser transportada para a membrana mitocondrial, para desencadear a apoptose. No entanto, não se observou alterações significativas na expressão da proteína Bax nas células MCF7 tratadas com os fitoquímicos eugenol e genisteína, comparando com as células controlo. Por outro lado, a proteína Bcl-xl (também pertencente à família Bcl-2) atua como anti-apoptótica por inibição da libertação dos constituintes da mitocôndria, como o citocromo c. Contudo, não se observou qualquer alteração na sua expressão. Aparentemente as DSBs induzidas pelos fitoquímicos elemicina e eugenol não influenciam a expressão da Bax e do Bcl-xl.

Relativamente ao controlo interno utilizado para os extratos nucleares no estudo da expressão das proteínas ATM e γ -H2AX, a proteína Lamina B1, esta interage com proteínas associadas à membrana nuclear para formarem a lamina nuclear no interior do envelope nuclear. No entanto, como se pode ver pelos resultados obtidos, a expressão não foi homogénea, como seria de esperar num controlo interno, inclusive não se observou expressão da proteína nas células controlo. A expressão da proteína Lamina B1 está diminuída em tecidos tumorais como tecidos dos cancro do útero, do esófago, da próstata e da mama (Liu *et al.*, 2013); esta proteína sequestra diretamente Oct-1 (factor de transcrição expresso no núcleo), regulando genes envolvidos em processos celulares como a senescência e a resposta a stress oxidativo (Malhas *et al.* 2009). Em estudos anteriores, foi possível observar que o tratamento de células humanas de cancro do cólon HT29 e de ratinho expostas ao β -asarone leva ao aumento dos níveis de expressão da Lamina B1, o que induziu a expressão de p53 e p21, recrutou Oct-1 para o envelope nuclear e impediu a sua ligação ao p15, induzindo a expressão do p15. Com estas observações, os autores concluíram que o tratamento com

β -asarone inibiu a carcinogênese coloretal pela indução da senescência celular, com um possível envolvimento da Lamina B1 (Liu *et al.*, 2013). Uma vez que o β -asarone faz parte da família dos alquenilbenzenos, como os fitoquímicos em estudo neste trabalho, o mecanismo através do qual a expressão da Lamina B1 está a ser alterada nas células MCF7, pode ser o mesmo ou semelhante. Uma alternativa à Lamina B1 seria a utilização da proteína TBP. Esta proteína é um fator de transcrição que se liga especificamente à sequência TATA box do DNA antes de ser realizada a transcrição do gene pela RNA polimerase II (Johnson, 2012).

Foi já demonstrado que a miristicina diminui a expressão de genes envolvidos na sinalização de lesões do DNA, como *RAD50*, *RAD51*, *ATM*, *GADD45A* e *GADD45G* (Martins *et al.*, 2014). Tendo isto em conta, investigou-se se essa diminuição de expressão estaria associada a alterações no padrão de metilação. Em relação ao gene *DAPK1* (gene envolvido na indução da apoptose), não se observou alteração no padrão de metilação ao longo dos 15 dias de incubação com os fitoquímicos. Por outro lado, aos 3 dias de incubação com a elemicina a região promotora do gene *GSTP1* (gene responsável pela destoxificação de muitos xenobióticos) encontra-se completamente metilada, o mesmo ocorre aos 9 dias de tratamento das células com o eugenol. O facto da região promotora do gene *GSTP1* ficar completamente metilada, leva a concluir que pode haver uma total depleção dos níveis da proteína glutatióno S-transferase da classe Pi 1, o que pode estar associado a uma acumulação de compostos tóxicos no interior da célula, que se irão ligar ao DNA formando aductos e podendo induzir a apoptose. No entanto, o tratamento das células com genisteína, ao contrário do esperado, não alterou o padrão de metilação do gene *GSTP1*, o que difere dos resultados obtido por King-Batoon e seus colaboradores. Os autores demonstraram que ao fim de uma semana de tratamento com genisteína, em células de cancro da mama MDA-MB-468, houve desmetilação da região promotora do gene *GSTP1*, o que por consequência restaurou a sua expressão (King-Batoon *et al.*, 2008). A região promotora do gene supressor de tumor *RASSF1A* foi parcialmente desmetilada pela elemicina aos 15 dias de incubação e o mesmo efeito teve o eugenol aos 3 e 6 dias de incubação. No entanto, e uma vez mais, o efeito desmetilante do eugenol não se observou nos dias de incubação posteriores, voltando a região a estar completamente metilada. A desmetilação da região promotora deste gene pode levar a que haja um restauro da sua expressão, podendo levar à paragem do ciclo celular e à indução da apoptose.

Em relação ao microRNA supressor de tumor *miR124-3*, a elemicina não teve efeito na metilação da sua região promotora. Por outro lado aos 15 dias de incubação com o eugenol a região promotora do gene ficou completamente metilada; o mesmo se observou com a genisteína aos 9 e 12 dias de incubação. Mais uma vez, os efeitos do fitoquímico não se mantiveram ao longo do período de exposição, pois aos 15 dias de incubação a região promotora do *miR124-3* voltou a ficar parcialmente metilada. A metilação total da região promotora deste microRNA pode levar à depleção completa dos seus níveis no interior da célula, o que poderá levar a uma proliferação celular descontrolada. O facto da elemicina e do eugenol alterarem o padrão metilação de vários genes, torna-os candidatos a novos agentes, tanto como quimiopreventivos como na terapia epigenética.

Em conclusão, observou-se que os fitoquímicos em estudo não são significativamente citotóxicos durante uma exposição prolongada a 10 μ M em células de cancro da mama MCF7. Por

outro lado, foi possível observar, através da fosforilação da proteína H2AX, que a elemicina e o eugenol induzem os mecanismos de sinalização de quebras de dupla cadeia no DNA. Demonstrou-se, também, que os fitoquímicos, em especial a elemicina e o eugenol, influenciam a metilação da região promotora dos genes *GSTP1* e *RASSF1A* e do *miR124-3*. Pela primeira vez, foi demonstrado que os fitoquímicos elemicina e eugenol têm ação modeladora da metilação do DNA a baixas concentrações, podendo ter influência na inibição ou reversão de fases iniciais da carcinogênese através da modulação do padrão de metilação da região promotora de genes.

No futuro, e como continuação deste trabalho, será importante estudar a expressão dos genes *GSTP1* e *RASSF1A* e do *miR124-3*, tanto através da técnica de Western Blot como da técnica de RT-qPCR, com o intuito de avaliar se a alteração do padrão de metilação das suas regiões promotoras se reflete na alteração da sua expressão. Será, também, bastante importante realizar este mesmo estudo na linha celular de cancro da mama MDA-MB-231, uma vez que esta linha celular tem características distintas da linha celular tumoral utilizada neste trabalho. Da mesma forma, será importante realizar o estudo numa linha celular de mama normal, de forma a comparar os efeitos dos fitoquímicos numa linha celular tumoral e numa linha celular normal.

BIBLIOGRAFIA

- Aune, D., Chan, D. S. M., Vieira, a R., Rosenblatt, D. a N., Vieira, R., Greenwood, D. C., e Norat, T. 2012. Fruits, vegetables and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Research and Treatment* 134(2): 479–93.
- Bakken, K., Fournier, A., Lund, E., Waaseth, M., Dumeaux, V., Clavel-Chapelon, F., Fabre, A., Hémon, B., Rinaldi, S., Chajes, V., Slimani, N., Allen, N. E., Reeves, G. K., Bingham, S., Khaw, K., Olsen, A., Tjønneland, A., Rodriguez, L., Sánchez, M., Etzezarreta, P. A., Ardanaz, E., Tormo, M., Peeters, P. H., van Gils, C. H., Steffen, A., Schulz, M., Chang-Claude, J., Kaaks, R., Tumino, R., Gallo, V., Norat, T., Riboli, E., Panico, S., Masala, G., González, C. a, e Berrino, F. 2011. Menopausal hormone therapy and breast cancer risk: impact of different treatments. *The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 128(1): 144–56.
- Ban, K. a, e Godellas, C. V. 2014. Epidemiology of breast cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 23(3): 409–22.
- Bodell, W. J., Ye, Q., Pathak, D. N., e Pongracz, K. 1998. Oxidation of eugenol to form DNA adducts and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: role of quinone methide derivative in DNA adduct formation. *Carcinogenesis* 19(3): 437–43.
- Brooks, P. J., e Zakhari, S. 2013. Moderate alcohol consumption and breast cancer in women: from epidemiology to mechanisms and interventions. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 37(1): 23–30.
- Choudhury, J. D., Kumar, S., Mayank, V., Mehta, J., e Bardalai, D. 2012. A Review On Apoptosis & Its Different Pathway. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research* 3(7): 848–861.
- Cichon, M. a, Degnim, A. C., Visscher, D. W., Radisky, D. C. 2010. Microenvironmental influences that drive progression from benign breast disease to invasive breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15(4)4 389–97.
- Coughlin, S. S., e Cypel, Y. 2013. Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance 19–35.
- Dandawate, P., Padhye, S., Ahmad, A., e Sarkar, F. H. 2013. Novel strategies targeting cancer stem cells through phytochemicals and their analogs. *Drug Delivery and Translational Research* 3(2): 165–182.
- Dawson, M. a, e Kouzarides, T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150(1): 12–27.
- DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., Alteri, R., Robbins, A. S., e Jemal, A. 2014. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. CA: A Cancer Journal for Clinicians.
- De Vincenzi, M., De Vincenzi, a, e Silano, M. 2004. Constituents of aromatic plants: elemicin. *Fitoterapia* 75(6): 615–8.

- Dong, J., He, K., Wang, P., e Qin, L. 2011. Dietary fiber intake and risk of breast cancer : a meta-analysis of, 900–905.
- Downs-Holmes, C., e Silverman, P. 2012. Breast cancer: Overview & updates. *The Nurse Practitioner* 36(12): 20-26.
- Dworkin, A. M., Huang, T. H.-M., e Toland, A. E. 2009. Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Seminars in Cancer Biology* 19(3): 165–71.
- Eisemann, N., Waldmann, a, e Katalinic, a. 2013. Epidemiology of Breast Cancer - Current Figures and Trends. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde* 73(2): 130–135.
- Fang, M. Z., Chen, D., Sun, Y., Jin, Z., Christman, J. K., e Yang, C. S. 2005. Reversal of hypermethylation and reactivation of p16INK4a, RARbeta, and MGMT genes by genistein and other isoflavones from soy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11(19): 7033–41.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, e Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 29/07/2014.
- Foulks, J. M., Parnell, K. M., Nix, R. N., Chau, S., Swierczek, K., Saunders, M., Wright, K., Hendrickson, T. F., Ho, K., McCullar, M. V., e Kanner, S. B. 2012. Epigenetic drug discovery: targeting DNA methyltransferases. *Journal of Biomolecular Screening* 17(1): 2–17.
- Fragkos, M., e Beard, P. 2011. Mitotic catastrophe occurs in the absence of apoptosis in p53-null cells with a defective G1 checkpoint. *PloS One* 6(8): e22946.
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O., e Samali, A. 2010. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology* 2010: 214074.
- Gerhauser, C. 2012. Cancer chemoprevention and nutri-epigenetics: state of the art and future challenges. *Natural Products in Cancer Prevention and Therapy*.
- Ghosh, R., Nadiminty, N., Fitzpatrick, J. E., Alworth, W. L., Slaga, T. J., e Kumar, A. P. 2005. Eugenol causes melanoma growth suppression through inhibition of E2F1 transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280(7): 5812–9.
- Gómez-Díaz, E., Jordà, M., Peinado, M. A., e Rivero, A. 2012. Epigenetics of host-pathogen interactions: the road ahead and the road behind. *PLoS Pathogens* 8(11): e1003007.
- Gravina, G. L., Festuccia, C., Marampon, F., Popov, V. M., Pestell, R. G., Zani, B. M., e Tombolini, V. 2010. Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. *Molecular Cancer* 9(1): 305.
- Gros, C., Fahy, J., Halby, L., Dufau, I., Erdmann, A., Gregoire, J.-M., Ausseil, F., Vispé, S., e Arimondo, P. B. 2012. DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie* 94(11): 2280–96.
- Halaby, M., e Hakem, R. 2010. Double Strand Break Signaling in Health and Diseases, DNA Repair and Human Health. InTech, Rijeka, Croatia.

- Hanahan, D., e Weinberg, R. A. 2011. Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144(5): 646–674.
- Hasheminejad, G., Caldwell, J., 1994. Genotoxicity of the alkenylbenzenes alpha- and beta-asarone, myristicin and elimicin as determined by the UDS assay in cultured rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 32(3): 223-31.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D., e Baylin, S. B. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(18): 9821–6.
- Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Garshell, J., Miller, D., Altekruse, S. F., Kosary, C. L., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D. R., Chen, H. S., Feuer, E. J., e Cronin, K. A. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/, based on November 2013 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2014.
- Huang, J., Plass, C., e Gerhauser, C. 2011. Cancer chemoprevention by targeting the epigenome. *Current Drug Targets* 12(13): 1925–56.
- Huang, Y., Pastor, W. a, Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D. R., e Rao, A. 2010. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PloS One* 5(1): e8888.
- Jaganathan, S. K., e Supriyanto, E. 2012. Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. *Molecules* 17(6): 6290–304.
- Jekimovs, C., Bolderson, E., Suraweera, A., Adams, M., O'Byrne, K. J., e Richard, D. J. 2014. Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising. *Frontiers in Oncology* 4(April): 86.
- Jin, Z., & El-deiry, W. S. (2005). Overview of Cell Death Signaling Pathways. *Cancer Biology & Therapy* 4(2): 139–163.
- Johnson, M. 2012. Controles de carregamento em Western Blot. Versão 21 de Outubro de 2013. <http://www.labome.com.br/method/Loading-Controls-for-Western-Blots.html>
- Kastan, M. B., e Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015): 316–23.
- Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, a W., Helzlsouer, K. J., Alberg, a J., Rollison, D. E., Dorgan, J. F., Brtion, L. a, Overvad, K., Kaaks, R., Trichopoulou, A., Clavel-Chapelon, F., Panico, S., Duell, E. J., Peeters, P. H. M., Rinaldi, S., Fentiman, I. S., Dowsett, M., Manjer, J., Lenner, P., Hallmans, G., Baglietto, L., English, D. R., Giles, G. G., Hopper, J. L., Severi, G., Morris, H., a Hankinson, S. E., Tworoger, S. S., Koenig, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Arslan, a a, Toniolo, P., Shore, R. E., Krogh, V., Micheli, A., Berrino, F., Barrett-Connor, E., Laughlin, G., a Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R. G., Neriishi, K., Land, C. E., Cauley, J., a Lui, L. Y., Cummings, S. R., Gunter, M. J., Rohan, T. E., e Strickler, H. D. 2011. Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *British Journal of Cancer* 105(5): 709–22.
- Khan, S. I., Aumsuwan, P., Khan, I. a, Walker, L. a, e Dasmahapatra, A. K. 2011. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chemical Research in Toxicology* 25(1): 61–73.

- King-Batoon, A., Leszczynska, J. M., e Klein, C. B. 2008. Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49(1): 36–45.
- Kobayashi, M., Tsutsui, T. W., Kobayashi, T., Ohno, M., Higo, Y., Inaba, T., e Tsutsui, T. 2013. Sensitivity of human dental pulp cells to eighteen chemical agents used for endodontic treatments in dentistry. *Odontology/the Society of the Nippon Dental University* 101(1): 43–51.
- Kwon, J.-S., Illeperuma, R. P., Kim, J., Kim, K.-M. e Kim, K.-N. 2014. Cytotoxicity evaluation of zinc oxide-eugenol and non-eugenol cements using different fibroblast cell lines. *Acta Odontologica Scandinavica* 72(1): 64-70.
- Lee, J. H., Khor, T. O., Shu, L., Su, Z.-Y., Fuentes, F., e Kong, A.-N. T. 2013. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. *Pharmacology & Therapeutics* 137(2): 153–71.
- Lewandowska, U., Gorlach, S., Owczarek, K., e Hrabec, E. 2014. Synergistic Interactions Between Anticancer Chemotherapeutics and Phenolic Compounds and Anticancer Synergy Between Polyphenols * Oddziaływania synergistyczne między chemoterapeutykami przeciwnowotworowymi i związkami fenolowymi oraz synergizm przeciwnowo. *Postepy Hig Med Dosw* 68: 528–540.
- Li, L.-C., e Dahiya, R. 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics (Oxford, England)* 18(11): 1427–31.
- Li, Y., Chen, H., Hardy, T. M., e Tollefsbol, T. O. 2013. Epigenetic regulation of multiple tumor-related genes leads to suppression of breast tumorigenesis by dietary genistein. *PloS One* 8(1): e54369.
- Li, Z., Li, J., Mo, B., Hu, C., Liu, H., Qi, H., Wang, X., e Xu, J. 2008. Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 22(7): 1749–53.
- Liu, L., Wang, J., Shi, L., Zhang, W., Du, X., Wang, Z., e Zhang, Y. 2013. β -Asarone induces senescence in colorectal cancer cells by inducing lamin B1 expression. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 20(6): 512–20.
- Lopez-Contreras, A. J., e Fernandez-Capetillo, O. 2012. Signalling DNA Damage, Protein Phosphorylation in Human Health. InTech, Rijeka, Croatia.
- Lord, C. J., e Ashworth, A. 2012. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481(7381): 287–94.
- Majid, S., Dar, A. a, Shahryari, V., Hirata, H., Ahmad, A., Saini, S., Tanaka, Y., Dahiya, A. V., e Dahiya, R. 2010. Genistein reverses hypermethylation and induces active histone modifications in tumor suppressor gene B-Cell translocation gene 3 in prostate cancer. *Cancer* 116(1): 66–76.
- Malhas, A. N., Lee, C. F., e Vaux, D. J. 2009. Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1. *The Journal of Cell Biology* 184(1): 45–55.

- Maralhas, A., Monteiro, A., Martins, C., Kranendonk, M., Laires, A., Rueff, J., e Rodrigues, A. S. 2006. Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol. *Mutagenesis* 21(3): 199–204.
- Martins, C., Doran, C., Laires, A., Rueff, J., e Rodrigues, A. S. 2011. Genotoxic and apoptotic activities of the food flavourings myristicin and eugenol in AA8 and XRCC1 deficient EM9 cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Associatio*, 49(2): 385–92.
- Martins, C., Doran, C., Silva, I. C., Miranda, C., Rueff, J., e Rodrigues, A. S. 2014. Myristicin from nutmeg induces apoptosis via the mitochondrial pathway and down regulates genes of the DNA damage response pathways in human leukaemia K562 cells. *Chemico-Biological Interactions* 218: 1–9.
- Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F., e Garcia-Closas, M. 2010. Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular Oncology* 4(3): 174–91.
- Mckinnon, P. J. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Reports* 5(8): 772–776.
- Medina-Franco, J. L., López-Vallejo, F., Kuck, D., e Lyko, F. 2011. Natural products as DNA methyltransferase inhibitors: a computer-aided discovery approach. *Molecular Diversity* 15(2): 293–304.
- Meeran, S. M., Ahmed, A., e Tollefsbol, T. O. 2010. Epigenetic targets of bioactive dietary components for cancer prevention and therapy. *Clinical Epigenetics* 1(3-4): 101–116.
- Miller, E. C., Swanson, a B., Phillips, D. H., Fletcher, T. L., Liem, a, e Miller, J. a. 1983. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Research* 43(3): 1124–34.
- Mirza, S., Sharma, G., Parshad, R., Gupta, S. D., Pandya, P., e Ralhan, R. 2013. Expression of DNA methyltransferases in breast cancer patients and to analyze the effect of natural compounds on DNA methyltransferases and associated proteins. *Journal of Breast Cancer* 16(1): 23–31.
- Nandakumar, V., Vaid, M., e Katiyar, S. K. 2011. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis* 32(4): 537–44.
- Nowsheen, S., Aziz, K., Tran, P. T., Gorgoulis, V. G., Yang, E. S., e Georgakilas, A. G. 2012. Epigenetic inactivation of DNA repair in breast cancer. *Cancer Letters* 342(2): 213–22.
- Ong, T. P., Moreno, F. S., e Ross, S. A. 2012. Targeting the Epigenome with Bioactive Food Components for Cancer Prevention. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 900: 275–292.
- Orta, M. L., Calderón-Montaño, J. M., Domínguez, I., Pastor, N., Burgos-Morón, E., López-Lázaro, M., Cortés, F., Mateos, S., e Helleday, T. 2013. 5-Aza-2'-deoxycytidine causes replication lesions that require Fanconi anemia-dependent homologous recombination for repair. *Nucleic Acids Research* 41(11): 5827–36.
- Palii, S. S., Van Emburgh, B. O., Sankpal, U. T., Brown, K. D., e Robertson, K. D. 2008. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that

is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Molecular and Cellular Biology* 28(2): 752–71.

- Paluszczak, J., Krajka-Kuźniak, V., e Baer-Dubowska, W. 2010. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells. *Toxicology Letters* 192(2): 119–25.
- Phipps, A. I., Chlebowski, R. T., Prentice, R., McTiernan, A., Wactawski-Wende, J., Kuller, L. H., Adams-Campbell, L. L., Lane, D., Stefanick, M. L., Vitolins, M., Kabat, G. C., Rohan, T. E., e Li, C. I. 2011. Reproductive history and oral contraceptive use in relation to risk of triple-negative breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 103(6): 470–7.
- Pietenpol, J. a, e Stewart, Z. a. 2002. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182: 475–81.
- Polyak, K. 2007. Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation* 117(11): 3155–3163.
- Portela, A., e Esteller, M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* 28(10): 1057–68.
- Sajjadi, S., Shokoohinia, Y., Hemmati, S., Gholamzadeh, S., e Behbahani, M. 2012. Antiviral activity of elemicin from *Peucedanum pastinacifolium*. *Research in Pharmaceutical Sciences* 7(5).
- Sandoval, J. e Esteller, M.. 2012. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development* 22(1): 50–5.
- Sasaki, M., Anast, J., Bassett, W., Kawakami, T., Sakuragi, N., e Dahiya, R. 2003. Bisulfite conversion-specific and methylation-specific PCR: a sensitive technique for accurate evaluation of CpG methylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309(2): 305–309.
- Schnekenburger, M., Dicato, M., e Diederich, M. 2014. Plant-derived epigenetic modulators for cancer treatment and prevention. *Biotechnology Advances* 32(6): 1123–1132.
- Scully, R., e Xie, A. 2013. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation Research* 750(1-2): 5–14.
- Shankar, S., Kumar, D., e Srivastava, R. K. 2013. Epigenetic modifications by dietary phytochemicals: implications for personalized nutrition. *Pharmacology & Therapeutics* 138(1): 1–17.
- Sharma, S., Kelly, T. K., e Jones, P. a. 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31(1): 27–36.
- Shon, Y.-H., Park, S.-D., e Nam, K.-S. 2006. Effective chemopreventive activity of genistein against human breast cancer cells. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39(4): 448–51.
- Singh, B. N., Singh, H. B., Singh, a, Naqvi, A. H., e Singh, B. R. 2014. Dietary phytochemicals alter epigenetic events and signaling pathways for inhibition of metastasis cascade: Phyto blockers of metastasis cascade. *Cancer Metastasis Reviews* 33:41–85.
- Singh, R., George, J., e Shukla, Y. 2010. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. *Cell Division* 5(1): 4.

- Sinicrope, F. A., e Dannenberg, A. J. 2010. Obesity and Breast Cancer Prognosis: Weight of the Evidence. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(1): 4–6.
- Stefanska, B., Karlic, H., Varga, F., Fabianowska-Majewska, K., e Haslberger, A. 2012. Epigenetic mechanisms in anti-cancer actions of bioactive food components – the implications in cancer prevention. *British Journal of Pharmacology* 167(2): 279–97.
- Stefansson, O. a, e Esteller, M. 2013. Epigenetic modifications in breast cancer and their role in personalized medicine. *The American Journal of Pathology* 183(4): 1052–63.
- Su, Z., Shu, L., Khor, T. O., Lee, J. H., e Fuentes, F. 2012. A Perspective on Dietary Phytochemicals and Cancer Chemoprevention : Oxidative Stress, Nrf2, and Epigenomics. *Topics in Current Chemistry* 329: 133–62.
- Supic, G., Jagodic, M., e Magic, Z. 2013. Epigenetics: a new link between nutrition and cancer. *Nutrition and Cancer* 65(6): 781–92.
- Tapsell, L. C., David, R., Michael, F., Beatrice, J., Marshall, P., Virginia, A., e Karen, E. 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *The Medical Journal Of Australia* 185(4).
- Thakur, V. S., Deb, G., Babcook, M. a, e Gupta, S. 2013. Plant phytochemicals as epigenetic modulators: role in cancer chemoprevention. *The AAPS Journal* 16(1): 151–63.
- Thompson, D., e Norbeck, K. 1989. Peroxidase-catalyzed Oxidation of Eugenol: Formation of a Cytotoxic Metabolite(s)*. *The Journal of Biological Chemistry* 264(2): 1016–1021.
- van den Berg, S. J. P. L., Punt, A., Soffers, A. E. M. F., Vervoort, J., Ngeleja, S., Spenkelink, B., e Rietjens, I. M. C. M. 2012. Physiologically based kinetic models for the alkenylbenzene elemicin in rat and human and possible implications for risk assessment. *Chemical Research in Toxicology* 25(11): 2352–67.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., e Berneman, Z. N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36(3): 131–49.
- Vidhya, N., e Devaraj, S. N. 2011. Induction of apoptosis by eugenol in human breast cancer cells. *Indian Journal of Experimental Biology* 49(11): 871–8.
- Xiang, N., Zhao, R., Song, G., Zhong, W. 2008. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 29(11): 2175–81.
- Xie, Q., Bai, Q., Zou, L.-Y., Zhang, Q.-Y., Zhou, Y., Chang, H., Yi, L., Zhu, J.-D., e Mi, M.-T. 2014. Genistein inhibits DNA methylation and increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes, Chromosomes & Cancer* 53(5): 422–31.
- Yaghjyan, L., Colditz, G. a, Collins, L. C., Schnitt, S. J., Rosner, B., Vachon, C., e Tamimi, R. M. 2011. Mammographic breast density and subsequent risk of breast cancer in postmenopausal women according to tumor characteristics. *Journal of the National Cancer Institute* 103(15): 1179–89.
- Yang, X., Yan, L., e Davidson, N. E. 2001. DNA methylation in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8: 115–128.

- Yoo, C.-B., Han, K.-T., Cho, K.-S., Ha, J., Park, H.-J., Nam, J.-H., Kil, U.-H., e Lee, K.-T. 2005. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Letters* 225(1): 41–52.
- You, J. S., e Jones, P. a. 2012. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell* 22(1): 9–20.
- Zha, S., Sekiguchi, J., Brush, J. W., Bassing, C. H., e Alt, F. W. 2008. Complementary functions of ATM and H2AX in development and suppression of genomic instability. *PNAS* 105(27): 9302–9306.
- Zhang, Y., Bailey, V., Puleo, C. M., Easwaran, H., Griffiths, E., Herman, J. G., Baylin, S. B., e Tza-Huei, W. 2010. DNA methylation analysis on a droplet-in-oil PCR array. *Lab on a Chip* 9(8): 1059–1064.
- Zhou, Y., Feng, H., Dai, L., Yang, Y., Bai, Y., Wang, Q., Jena, P., Amerongen, M. J., Van Ghosh, S., Sajjad, A., Novoyatleva, T., Mogha, A., Monk, K. R., Engel, F. B., Reyes-gutierrez, P. e Pederson, T. 2013. Correction for Zhou et al., Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(48): 19390–19395.
- Zhu, H., Liu, Z., Tang, L., Liu, J., Zhou, M., Xie, F., Wang, Z., Wang, Y., Shen, S., Hu, L., e Yu, L. 2012. Reversal of P-gp and MRP1-mediated multidrug resistance by H6, a gypenoside aglycon from *Gynostemma pentaphyllum*, in vincristine-resistant human oral cancer (KB/VCR) cells. *European Journal of Pharmacology* 696(1-3): 43–53.

ANEXOS

Secção I

Tabela Anexos.1 – Quantificação de extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares e de DNA e RNA obtidos após exposição prolongada de 15 dias aos fitoquímicos α -asarone, β -asarone, curcumina, elemicina, eugenol, genisteína e miristicina, a uma concentração de 10 μ M, em células de cancro da mama MDA-MB-231.

Fitoquímico	Tempo (dias)	Extratos proteicos citoplasmáticos (μ g/mL)	Extratos proteicos nucleares (μ g/mL)	DNA (ng/ μ L)	RNA (ng/ μ L)
α -asarone	3	-1220,4	-1028,5	14,99	244,19
	6	21,1	897,2	20,15	324,01
	9	5459,7	4211,3	9,72	
	12	5415,7	2440,3	9,66	-
	15	-	-	-	-
β -asarone	3	647,2	2636,5	17,18	1309,62
	6	4994,3	4537,4	22,90	765,63
	9	4684,4	3051,1	-	-
	12	5587,2	3785,0	30,89	771,78
	15	7964,1	5349,8	98,64	1234,21
Curcumina	3	4847,4	3534,8	22,1	728,2
	6	4638,6	2790,5	39,67	1082,61
	9	5234,9	2181,7	8,50	299,39
	12	5142,5	3216,7	23,87	269,47
	15	5970,0	3900,5	58,36	633,47
Elemicina	3	252,4	2488,4	22,47	-
	6	-237,8	1860,0	11,22	837,30
	9	4608,3	3955,9	38,28	876,87
	12	5589,5	4367,6	27,45	1459,79
	15	-	-	-	-
Eugenol	3	346,9	2513,0	40,82	796,31
	6	3629,0	3011,3	35,88	673,69
	9	5686,1	3185,5	36,54	681,36
	12	4786,2	3497,3	52,13	806,52
	15	10172,3	7064,5	109,87	1136,45
Genisteína	3	998,8	2910,8	30,95	924,27
	6	3964,0	2458,1	20,16	599,665
	9	5568,7	2940,3	21,44	410,70
	12	5654,6	3385,7	27,90	409,26
	15	9795,1	6008,8	45,78	1030,45
Miristicina	3	4547,2	4270,6	28,31	973,35
	6	6254,3	4116,1	12,22	651,31
	9	3235,4	1997,7	13,09	172,35
	12	4494,7	2534,3	8,73	89,48
	15	5311,8	3242,7	18,91	217,71

Tabela Anexos.2 – Quantificação de extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares e de DNA e RNA obtidos após exposição prolongada de 15 dias aos fitoquímicos elemicina, eugenol e genisteína, a uma concentração de 10µM, em células de cancro da mama MCF7.

Fitoquímico	Tempo (dias)	Extratos proteicos citoplasmáticos (µg/mL)	Extratos proteicos nucleares (µg/mL)	DNA (ng/µL)	RNA (ng/µL)
Elemicina	3	4139,1	2700,9	100,39	1378,56
	6	6641,8	4811,8	89,01	1714,09
	9	5981,2	4690,9	139,66	1067,27
	12	5707,5	4257,7	186,90	1620,02
	15	3884,7	2746,1	120,75	1313,86
Eugenol	3	3582,8	2997,3	175,95	1890,31
	6	2967,5	3754,9	96,83	944,71
	9	2693,7	4024,9	135,58	798,33
	12	4614,2	2460,5	157,13	1085,51
	15	4281,9	3291,1	123,59	1079,52
Genisteína	3	5237,0	3820,9	110,70	1061,68
	6	4875,0	4045,5	86,64	869,46
	9	4304,7	2675,3	277,43	2039,56
	12	4410,2	3378,8	174,01	1569,21
	15	5044,4	3523,3	235,83	1828,615

